

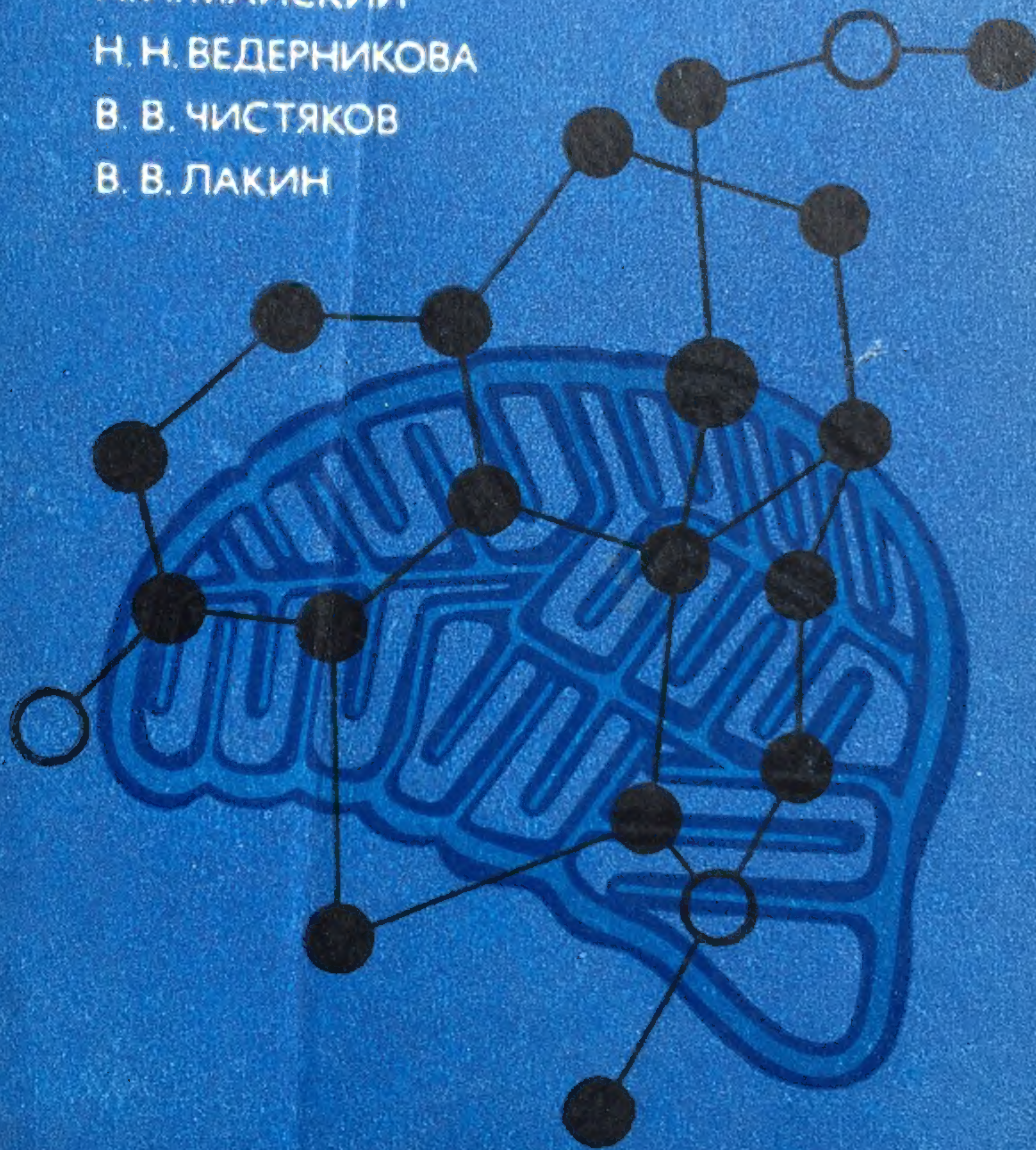
БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОМАНИЙ

А. И. МАЙСКИЙ

Н. Н. ВЕДЕРНИКОВА

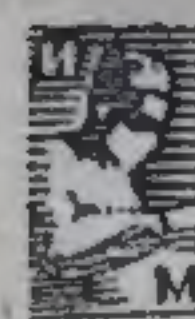
В. В. ЧИСТЯКОВ

В. В. ЛАКИН



А
В.

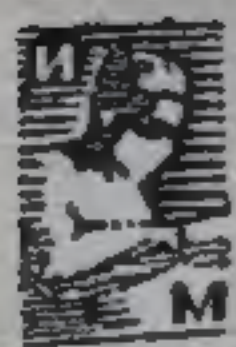
Б
А
Н



МОСКВА
«МЕДИЦИНА»
1982

А. И. МАЙСКИЙ, Н. Н. ВЕДЕРНИКОВА
В. В. ЧИСТЯКОВ, В. В. ЛАКИН

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОМАНИЙ



МОСКВА
«МЕДИЦИНА»
1982

ББК 52.84

Б 63

УДК 616.89-008.441.13-092

Майский А. И., Ведерникова Н. Н., Чистяков В. В., Лакин В. В.
БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОМАНИЙ.— М.: Медицина,
1982, 256 с., ил.

Авторы книги — специалисты в области молекулярной фармакологии.

В монографии впервые обобщены достижения в области экспериментальной наркологии. На современном уровне подробно рассмотрены вопросы о значении опиатных рецепторов и нейропептидов в патогенезе наркоманий. Дан анализ особенностей синаптической передачи в условиях действия наркотиков. Описаны данные о значении эндокринной системы в развитии отдельных стадий наркоманий. Рассмотрена роль генетических факторов в биологической предрасположенности к заболеванию алкоголизмом и наркоманиями. С современных позиций дан анализ основных путей метаболизма наркотиков и возможности их фармакологической регуляции.

Для фармакологов, биохимиков и нейрофизиологов.

В книге 10 табл., 27 рис., список литературы (145 названий).

Рецензент Н. К. БАРКОВ, доктор медицинских наук, зав. лабораторией НИИ судебной психиатрии им. В. П. Сербского Минздрава СССР.

Б $\frac{4118000000-367}{039(01)-82}$ 159—83

© Издательство «Медицина». Москва. 1982.

резу
мако
и фа
нить
кого
низм
след
ний
орга
рофа
разви
зыва
щих
ных
явля
деть
Не
мате
ной
осно
и не
обла
зало
глав
А. И
дерн
ским
слес
В
буно
наук
неко

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение	4
Глава 1. Опиатные рецепторы	6
Глава 2. Эндогенные лиганды с опиоидными свойствами. Их структура и функция	56
Глава 3. Механизм действия наркотических анальгетиков на уровне синаптической передачи нервных импульсов	116
Глава 4. Наркотики и эндокринная система	141
Глава 5. Метаболические эффекты наркотиков	162
Глава 6. Генетические аспекты патогенеза токсикоманий	205
Список литературы	240
Послесловие	246

*Алексей Иванович Майский, Наталья Николаевна Вёдерникова
Владимир Всеволодович Чистяков, Владимир Валентинович Лакин*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОМАНИЙ

Зав. редакцией Ю. В. Махотин. Редактор издательства С. В. Кузьмина.
Худ. редактор Н. А. Гурова. Переплет художника А. Е. Григорьева.
Техн. редактор С. П. Танцева. Корректор Л. А. Кокарева

ИБ № 3016

Сдано в набор 5.02.82. Подписано к печати 20.10.82. Т-15748. Формат бумаги 84×108¹/₃₂. Бум. тип. № 2. Литературная гарн. Печать высокая. Усл. печ. л. 13,44. Усл. кр. отт. 13,74. Уч.-изд. л. 14,36. Тираж 10 000 экз. Заказ № 4089. Цена 85 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина», Москва, Петроверигский пер., 6/8.

Типография им. Смирнова Смоленского облуправления издательств, полиграфии и книжной торговли, г. Смоленск, пр. им. Ю. Гагарина, 2.

ПРЕДИСЛОВИЕ

В данной книге в лаконичной форме изложены результаты исследований из области молекулярной фармакологии и физиологии ЦНС, а также биоэнергетики и фармакогенетики, позволяющие с новых позиций оценить причины развития зависимости от наркотиков и алкоголя. Несомненно, что успешная расшифровка механизмов, лежащих в основе патогенеза токсикоманий, а следовательно, и рациональная терапия этих заболеваний (или заболеваний?), возможна лишь при условии органического синтеза достижений нейробиологии, нейрофармакологии и психиатрии. В то же время логика развития науки, по нашему глубокому убеждению, указывает на первоочередную необходимость выяснения общих закономерностей функционирования и молекулярных процессов в деятельности ЦНС. Именно последние являются интегрирующим звеном, позволяющим увидеть цельную картину в мозаике разрозненных фактов. Не претендуя на исчерпывающее изложение огромного материала по патогенезу токсикоманий в столь скромной по объему монографии, мы хотели бы дать лишь основные сведения, позволяющие подчеркнуть важность и необходимость фундаментальных исследований в этой области и привлечь к ним внимание. Именно эта идея заложена в последовательно дополняющих друг друга главах монографии, из которых 1-я и 2-я написаны А. И. Майским, 3-я — В. В. Лакиным, 4-я — Н. Н. Ведерниковой, 5-я — В. В. Чистяковым и 6-я — А. И. Майским и Н. Н. Ведерниковой. Предисловие, введение и послесловие написаны А. И. Майским.

Выражаем благодарность докт. мед. наук Ф. Е. Горбунову, канд. биол. наук А. А. Ведерникову, канд. мед. наук А. А. Никонову за ценные советы при обсуждении некоторых разделов монографии.

ВВЕДЕНИЕ

История развития представлений о патогенезе психических заболеваний, в частности наркоманий, претерпела значительную эволюцию за несколько последних лет в связи с успехами в области молекулярной биологии и фармакологии ЦНС [Вартанян М. Е., Лиде-ман Р. Р., 1978; Ашмарин И. П. и др., 1978; Чиченков О. Н., 1978; Клуша В. Е., 1978; Машковский М. Д., 1979, и др.]

Не отрицая хорошо известного положения, согласно которому данные, полученные на модельных системах, не отражают всех аспектов нарушений в целом организме, следует особо подчеркнуть, что именно моделирование сложных процессов в эксперименте является единственно возможным путем, позволяющим оценить значение отдельных биохимических структур или даже определенных биологически активных молекул в развитии заболевания. Как показывает накопленный опыт, сопоставление особенностей функционирования нейронов в норме и патологии с психической деятельностью обеспечивает получение качественно новой информации о последней.

Данные современной нейробиологии свидетельствуют о принципиальной идентичности построения нервной системы у животных, особенно позвоночных, и человека. Именно это обстоятельство создает основу для экстраполяции результатов экспериментов, полученных на лабораторных животных, культурах нервных клеток и других модельных системах в клиническую практику. Несомненно, как ни сложна проблема наркоманий с ее ярко выраженной социальной окраской, основные биологические механизмы указанной патологии с успехом можно воспроизводить в эксперименте.

Учитывая многочисленность публикаций, посвященных патогенезу наркоманий, мы сочли целесообразным

основное внимание уделить исследованиям, которые все-сторонне и полно еще не обсуждались. Однако круг рассматриваемых в данной монографии проблем, по нашему мнению, создает достаточно полное представление о больших возможностях молекулярно-биологических подходов в изучении наркоманий и позволяет наметить новые пути для разработки способов коррекции выявляемых нарушений. Вместе с тем, оценивая накопленные данные, мы не стремились упрощать сложную картину взаимодействия наркотиков и алкоголя с биохимическими системами организма. Напротив, в ряде случаев акцентировали внимание именно на нерешенных вопросах, особенно в тех случаях, когда наметившиеся пути исследования казались нам наиболее плодотворными. Это относится в значительной степени к анализу физиологического значения и роли в рассматриваемой патологии различных популяций опиатных рецепторов и широкого спектра эндогенных пептидных и непептидных лигандов. В той же степени это касается и взаимодействия нервной и эндокринной систем регуляции. Предпринятая попытка системного анализа интегрирующей роли нейропептидов в этом взаимодействии, по-видимому, интересна не только в прикладном аспекте, но и в общебиологическом плане.

Несомненно, интересны сведения о специфическом изменении метаболизма при развитии наркоманий. Состояние биохимического гомеостаза в условиях действия наркотиков определяет как их центральные эффекты, так и характерные изменения на периферии. Нельзя игнорировать и генетические особенности, определяющие чувствительность организма к наркотикам. Как правило, контроль чувствительности к наркотическим веществам носит полигенный характер. Однако даже выявление одного или нескольких маркерных генов, несущих ответственность за предрасположенность организма к развитию привыкания и пристрастия, может иметь существенное значение для решения вопросов профилактики, лечения и прогноза заболевания.

Глава 1

ОПИАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Теоретически существование опиатных рецепторов предполагалось достаточно давно. С тех пор как J. Langley (1878) впервые предположил, что фармакологический эффект может быть обусловлен взаимодействием лекарственных препаратов с веществами нервных окончаний или клеток желез, а Р. Ehrlich и J. Morgenroth (1910) ввели в фармакологию термин «рецептор», проводились интенсивные поиски в организме различных структур или молекул, комплементарных биологически активным соединениям. Фармакологам представлялось очевидным, что широкий спектр действия опиатов, изменяющих многие биологические параметры, при наличии селективного распределения этих веществ возможен лишь в случае особой организации клеточных структур, определяющей эффекты опиатов в органах-мишенях.

В пользу существования рецептора, комплементарного молекуле морфина и его аналогам, свидетельствовали также данные по стереохимии углеродных атомов пиперидинового кольца: биологически активными были, как правило, лишь определенные стереоизомеры. В то же время методические трудности не позволяли получить прямых экспериментальных доказательств присутствия рецептора опиатов в организме.

Прогресс в этом отношении во многом был достигнут благодаря работам, вышедшим из лаборатории А. Goldstein (1971). Авторы исходили из известного положения, согласно которому большинство биологически активных соединений, включая опиаты, неспецифически взаимодействуют с тканевыми компонентами, маскирующими связывание этих веществ со специфическими рецепторными молекулами. Сотрудниками этой лаборатории были введены понятия о ненасыщаемом и насыщаемом неспецифическом взаимодействии и насыщаемом сте-

реоспи
фикац
вие х
с осм
или и
исслед
ренном
цирова
взаимо
средств
В част
ствова
пами б
полиса

Сле
относи
мого сл
ющие м
мые вз
нено п
неактив
взаимо
ясь со

На с
использ
морфин
фан. Ас
мозга м
(рис. 1
которые
взаимо
ется со
на. В эт
рации, м
заблоки
имодейс
будет в
дов. Ра
и Б, так
цифичес
варител
меченог
 [^3H]-лев
щаемых

реоспецифическом связывании. Согласно этой классификации, неспецифическое ненасыщаемое взаимодействие характерно для частиц, окруженных мембранами с осмотическими свойствами (например, синапсом) или имеющих губчатый матрикс, способный захватывать исследуемые вещества из окружающей среды в растворенном виде. Подобное взаимодействие нельзя квалифицировать как связывание. Неспецифическое насыщаемое взаимодействие теоретически может осуществляться посредством ионных, водородных и гидрофобных связей. В частности, опиаты могут неспецифически взаимодействовать катионными группировками с анионными группами белков, нуклеиновых кислот, фосфолипидов, мукополисахаридов и т. д.

Следовательно, методические подходы для измерения относительно малых количеств специфического насыщаемого связывания с рецепторами должны исключить имеющие место неспецифические насыщаемые и ненасыщаемые взаимодействия. Указанное требование было выполнено при использовании фармакологически активных и неактивных стереоизомеров опиатов. Последние могут взаимодействовать только неспецифически, не связываясь со специфическими рецепторами.

На основании этих предпосылок в экспериментах был использован радиоактивный леворфанол, D (—) агонист морфина, и его нерадиоактивный энантиомер — декстрорфан. Ассоциация [^3H]- или [^{14}C]-леворфанола с тканью мозга мышей измерялась в следующих трех условиях (рис. 1). А — в присутствии только [^3H]-леворфанола, который участвует во всех трех видах описанного выше взаимодействия; Б — система предварительно инкубируется со 100-кратным избытком немеченого декстрорфана. В этом случае [^3H]-леворфанол (в той же концентрации, как и в первом определении) будет естественно заблокирован от неспецифического насыщаемого взаимодействия. В то же время избыток декстрорфана не будет влиять на ненасыщаемое взаимодействие лигандов. Разница в уровне радиоактивности в системе А и Б, таким образом, будет характеризовать долю неспецифического насыщаемого связывания. В-система предварительно инкубируется со 100-кратным избытком немеченого леворфанола. В этих условиях ассоциация [^3H]-леворфанола будет заблокирована во всех насыщаемых связывающих местах (специфических и неспе-

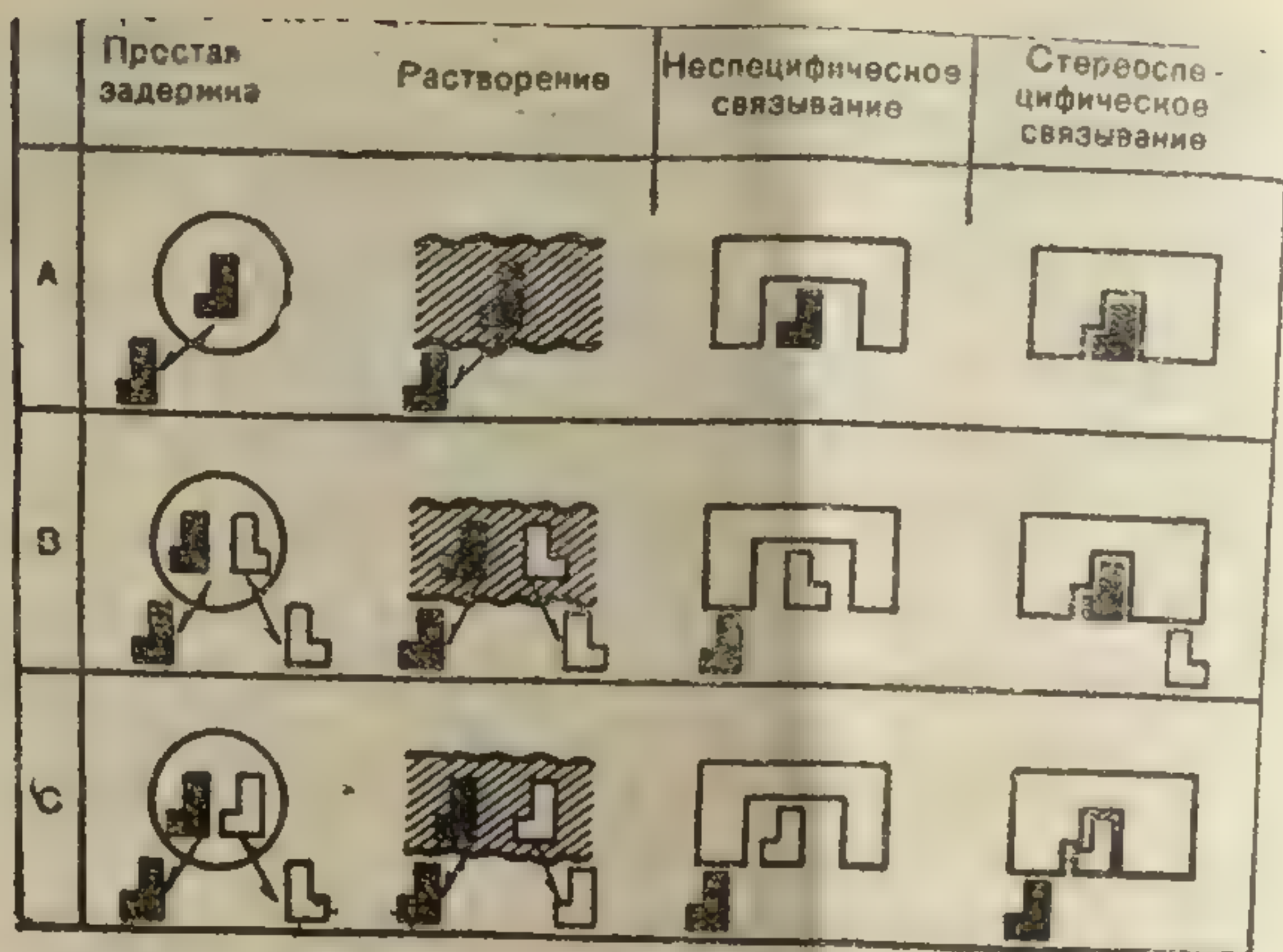


Рис. 1. Вытеснение леворфанола немечеными лигандами при различных типах связывания.

Темный символ (А, В, С)—радиоактивный леворфанол, светлый — немеченый лиганд (декстрорфан в случае В и леворфанол в случае С).

цифических), но не затронет ненасыщаемого взаимодействия. Таким образом, можно видеть, что арифметическим подсчетом при использовании этого метода можно вычислить уровень специфического связывания опиата.

Действительно, как показали проведенные эксперименты, около половины ассоциированного с тканью мозга леворфанола отражает ненасыщаемый тип взаимодействия. Примерно столько же препарата задерживается в ткани головного мозга за счет неспецифического насыщаемого связывания, и только 2% связавшегося соединения определяет специфическое взаимодействие с опиатным рецептором.

Предложенный путь оказался весьма плодотворным, и в марте 1973 г. появилось сообщение С. В. Pert и S. H. Snyder (1973), а затем и еще ряд публикаций из этой лаборатории [Pert C. B., Snyder S. H., 1973; Pert C. B. et al., 1973] с подробным анализом специфического связывания опиатов в гомогенатах мозга крыс и тонкой кишки морских свинок. В этих, ставших классическими экспериментах при использовании в качестве меченого лиганда [^3H]-налоксона было установлено, что леворфанол в концентрации 10^{-7} М снижает связывание антагониста в гомогенатах головного мозга крыс, мышей и морских свинок на 70%. В то же время дек-

строрф
ски не
этого
ческое
рирует
этих у
биолог
опреде
присут
ную ср
лумако
через
ние сп
ставля
ского
ры и п
тов до
кое св
рН 5,0
тором

Ско
рецепт
ных ус
сона в
ления
распад
уменьш
ветстве

Ана
ных мо
связыв
ционал
вызыва
в 4000
фан. D
сравне
метадо
D-анал
пени с
молеку
вует с
лял 1/1
препар
холин,

строрфан (биологически неактивный изомер) практически не препятствует ассоциации метки. На основании этого надо полагать, что он влияет лишь на неспецифическое связывание. Леворфанол в то же время конкурирует за специфический рецептор. Следовательно, в этих условиях эксперимента специфическое связывание биологически активного опиата с рецептором можно определить по разности связывания [^3H]-налоксона в присутствии декстрорфана и добавлении в инкубационную среду леворфанолола. В этих условиях при 37 °C полумаксимальное связывание налоксона фиксировалось через 2 мин с выходом на плато через 15 мин. Отношение специфического и неспецифического связывания составляло соответственно 2,5 и 3 к 1. Уровень специфического связывания, как оказалось, зависит от температуры и при 0 °C снижается на 90%. Нагревание гомогенатов до 55 °C в течение 10 мин блокировало специфическое связывание полностью. Оптимум pH равен 7,4, при pH 5,0 и 10,0 специфичное связывание опиата с рецептором не обнаруживается.

Скорость диссоциации комплекса [^3H]-налоксон — рецептор также исследовалась в различных температурных условиях при добавлении нерадиоактивного налоксона в концентрации 10^{-5} М через 15 мин после добавления меченого лиганда. Установлено, что время полураспада комплекса рецептор — лиганд снижается при уменьшении температуры инкубации и равняется соответственно 5,2 и 1 мин при 5, 15 и 25 °C.

Анализ способности различных биологически активных молекул вытеснять налоксон из специфических мест связывания показал, что аффинитет к рецептору пропорционален способности фармакологических препаратов вызывать аналгезию. Характерно, что леворфанол был в 4000 раз более активен, чем его энантиомер декстрорфан. D-изомер метадона был в 10 раз менее активен по сравнению с леворфанолом. В то же время L-изомер метадона только в 10 раз действовал менее активно D-аналога. Возможно, этот феномен в определенной степени связан с высокой конформационной лабильностью молекулы метадона. Кодеин очень слабо взаимодействует с опиатным рецептором, и его аффинитет составлял 1/100 от найденного для молекулы морфина. Такие препараты, как фенobarбитал, серотонин, норэпинефрин, холин, карбамилхолин, атропин, колхицин, гистамин,

чем агонистов. Так, налорфин уже в дозе 2 мг/кг снижал связывание меченого препарата на 50%, в то время как подобный эффект морфина выявлялся лишь при инъекции в дозе 100 мг/кг. Натриевая соль пентобарбитала, галоперидол и пимозид не влияли на связывание налоксона даже при введении в очень больших дозах. Легкий эфирный наркоз и холодовой стресс также не изменяли взаимодействия опиатного рецептора с лигандом.

Для решения вопроса о биологической значимости опиатного рецептора проводились специальные исследования, направленные на выявление корреляций между степенью стереоспецифического связывания соответствующих фармакологических препаратов и их эффективностью. Подобные сравнения были выполнены как в отношении подвздошной кишки морской свинки, так и рецепторов головного мозга крыс [Creese I., Snyder S. H., 1975; Höllt V. et al., 1976; Höllt V., Herz A., 1978]. Для большинства исследуемых препаратов на обеих моделях показана четкая связь между сродством вещества к опиатным рецепторам и выраженностью его обезболивающего действия. При использовании [^3H]-налоксона, [^3H]-налтрексона и [^3H]-дипренорфина установлено, что меченый агонист в большей степени вытесняется из рецептора немеченым антагонистом. Аналгезия, вызванная эторфином, блокируется при вытеснении его из опиатного рецептора налтрексоном. Аппликация следовых количеств [^3H]-налтрексона не выявила у морфинизированных крыс характерных симптомов физической зависимости. Введение возрастающих доз немеченого налтрексона приводило к вытеснению меченого препарата и развитию состояния абстиненции. Максимальное вытеснение налтрексона из рецептора наблюдалось в тех же дозах (300—1000 мг/кг), которые вызывали максимальное количество характерных стереоспецифических прыжков. Такая же четкая корреляция найдена и при использовании теста, «вокализации» у мышей при нанесении болевого стимула. Низкие дозы эторфина (0,2 мкг/кг) не влияли на этот показатель. При введении немеченого эторфина в возрастающих дозах развивалась аналгезия, выраженность которой зависела от занятости опиатных рецепторов. Таким образом, экспериментальное подтверждение получила концепция о действии опиатов через специфические рецепторы, имеющиеся в организме.

Локализация опиатных рецепторов в организме. Наличие специфических рецепторов подразумевает существование определенной организации чувствительных клеток (клеток-мишеней), обладающих способностью выборочно воспринимать химические сигналы и в соответствии с этим регулировать метаболизм и функциональную активность клеток. В свою очередь органная локализация клеток-мишеней обеспечивает особенности физиологического ответа отдельных систем, а часто и всего организма при действии эндогенного и экзогенного биологически активного соединения. В этой связи можно полагать, что в основе достижений, сделавших возможным физиологическое и патогенетическое обсуждение роли опиатных рецепторов в организме, лежат исследования их органного и клеточного распределения.

Уже первые работы, выявившие присутствие в организме рецепторов, специфически взаимодействующих с опиатами, продемонстрировали некоторые особенности их распределения. Вначале опиатные рецепторы были обнаружены в гомогенатах головного мозга крыс и мышей и тонкого кишечника морских свинок. В мозге крыс, как оказалось, эти рецепторы располагаются не диффузно, а концентрируются в определенных отделах [Pert C. B., Snyder S. H., 1973]. Максимальная концентрация участков, специфически связывающих [^3H]-налоксон, выявлена этими исследователями в полосатом теле. В меньших количествах опиатные рецепторы обнаружены в среднем мозге, коре больших полушарий и стволе мозга. В мозжечке не было выявлено опиатных рецепторов, хотя в последующих экспериментах *in vivo* они все же были обнаружены.

Более подробный анализ локализации опиатных рецепторов проведен с использованием радиоавтографической техники [Pert C. B. et al., 1975; Snyder S. H., 1975]. Для предотвращения диссоциации меченого опиата из комплекса с рецептором применялось низкотемпературное замораживание тканей. Установлено, что радиоактивные гранулы в высокой концентрации встречаются в хвостатом ядре. Относительно высокое содержание опиатных рецепторов выявляется в миндалевидном ядре, медиальном таламусе, поводке и перивентрикулярных областях мозга. Полагают, что наличие рецепторов опиатов в миндалевидном ядре указывает на участие последнего в развитии эйфорических эффектов опиатов.

Много
компа
эта об
ской р
станции
гранул

Под
цептор
методом
ния ди
крыс от
цептор
них отд
новном
риаквед
ружено
таламус
атных р
холмие,
тальное
лушарий
значител
цептор
ной изви
ше специ
коре. Н
[^3H]-диг
гопа gad

Сход
делении
на в раз
вскрыти
но, что м
как прав
ся к лим
вание ме
характер
видного
супраопт
сомедиал
го вещес
Столь же
торов отм
вилине, п

Много опиатных рецепторов обнаруживается также в компактной зоне черной субстанции. Как известно, эта область содержит тела нейронов с дофаминергической регуляцией. Напротив, в ретикулярной зоне субстанции фиксируется малое количество радиоактивных гранул.

Подробно исследовано и распределение опиатных рецепторов в мозге обезьян *Macaca mulata* биохимическим методом с регистрацией стереоспецифического связывания дигидроморфина. У этих животных в отличие от крыс отмечено очень высокое содержание опиатных рецепторов в миндалевидном ядре, особенно в его передних отделах. В среднем мозге опиатные рецепторы в основном концентрируются в районе серого вещества периакведукта. Значительное количество рецепторов обнаружено также в гипоталамусе и медиальных участках таламуса. Скорлупа содержит меньшее количество опиатных рецепторов, так же, как гиппокамп, верхнее двухолмие, ядра, расположенные между ножек мозга, фронтальное поле и верхняя височная извилина больших полушарий. Следует отметить, что кора головного мозга значительно различалась по содержанию опиатных рецепторов в различных отделах. В пре- и постцентральной извилине и окципитальном поле определялось меньше специфических мест связывания, чем во фронтальной коре. Низкие уровни стереоспецифического связывания [^3H]-дигидроморфина выявлены в мозолистом теле, свода *corpus radiata*, своде и перекресте зрительных нервов.

Сходные закономерности были выявлены и при определении стереоспецифического связывания [^3H]-эторфина в различных участках мозга человека, полученных на вскрытии [Simon E. J., Hiller J. M., 1978]. Четко показано, что максимальные количества опиатных рецепторов, как правило, ассоциируются с областями, относящимися к лимбической системе. В частности, высокое связывание меченого эторфина (от 0,44 до 0,23 пМ/мг белка) характерно для обонятельного треугольника, миндалевидного ядра, ядер перегородки, преоптической зоны и супраоптических ядер, а также вентромедиальных и дорсомедиальных ядер таламуса, подушки таламуса и серого вещества периакведукта и желудочков мозга. Столь же значительная концентрация опиатных рецепторов отмечается в височной доле, супраорбитальной извилине, парагиппокампальной извилине, фронтальной

зоне коры, островке и т. д. Авторы полагают, что эти данные прямо свидетельствуют об участии лимбической системы мозга человека в развитии эйфории при центральном действии опиатов.

В стволе мозга наибольшее количество опиатных рецепторов локализовано в ядрах *tractus solitarius*, который, как известно, содержит висцеральные сенсорные волокна от блуждающего и языкоглоточного нервов. Не исключено, что именно по этим волокнам осуществляется проведение болевых импульсов от внутренних органов, модулируемое посредством опиатных рецепторов. Методом радиоавтографии установлено, что радиоактивные гранулы располагаются в фибриллах блуждающего нерва и на их пути к *tractus solitarius*, прослеживаются вместе с ним при прохождении продолговатого мозга, нижних ножек мозжечка и спинального тракта тройничного нерва [Snyder S. H., Simantov R., 1977]. Отмечена высокая концентрация опиатных рецепторов по средней линии в комиссурах при слиянии двух билатерально расположенных ядер одиночного тракта.

Весьма важно, что методом радиоавтографии удалось также показать пресинаптическую локализацию опиатных рецепторов в п. *vagus* (гранулы исчезали при повреждении блуждающего нерва на уровне шеи). Эти данные подтверждаются и биохимическими исследованиями, в которых было показано уменьшение числа опиатных рецепторов при перерезке в области дорсального корешка блуждающего нерва [Lamotte C. et al., 1976]. По мнению авторов, локализация опиатных рецепторов в ядрах *tractus solitarius* определяет такие эффекты опиатов, как подавление кашлевого рефлекса, возникновение ортостатической гипотензии, нарушение синусного автоматизма и снижение секреторной функции клеток слизистой оболочки желудка. Присутствие опиатных рецепторов в *area postrema* ствола мозга, где находится триггерная зона хеморецепции, по-видимому, обуславливает появление тошноты и рвоты при введении опиатов. Значительная концентрация опиатных рецепторов в *retectal nuclei* ствола мозга, которые регулируют диаметр зрачка, определяет характерную симптоматику при введении морфина — булавочный зрачок.

Большое число опиатных рецепторов в добавочных волокнах зрительного нерва и его ядрах, а также в вентральных ядрах латеральных колленчатых тел заставляет

предполагать, что эти данные свидетельствуют об участии лимбической системы мозга человека в развитии эйфории при центральном действии опиатов.

Весьма важно, что методом радиоавтографии удалось также показать пресинаптическую локализацию опиатных рецепторов в п. *vagus* (гранулы исчезали при повреждении блуждающего нерва на уровне шеи). Эти данные подтверждаются и биохимическими исследованиями, в которых было показано уменьшение числа опиатных рецепторов при перерезке в области дорсального корешка блуждающего нерва [Lamotte C. et al., 1976]. По мнению авторов, локализация опиатных рецепторов в ядрах *tractus solitarius* определяет такие эффекты опиатов, как подавление кашлевого рефлекса, возникновение ортостатической гипотензии, нарушение синусного автоматизма и снижение секреторной функции клеток слизистой оболочки желудка. Присутствие опиатных рецепторов в *area postrema* ствола мозга, где находится триггерная зона хеморецепции, по-видимому, обуславливает появление тошноты и рвоты при введении опиатов. Значительная концентрация опиатных рецепторов в *retectal nuclei* ствола мозга, которые регулируют диаметр зрачка, определяет характерную симптоматику при введении морфина — булавочный зрачок.

Большое число опиатных рецепторов в добавочных волокнах зрительного нерва и его ядрах, а также в вентральных ядрах латеральных колленчатых тел заставляет

предполагать, что эти данные свидетельствуют об участии лимбической системы мозга человека в развитии эйфории при центральном действии опиатов.

предположить возможность модуляции нервных импульсов и в этой системе. Характерно, что удаление одного глаза у животного в эксперименте сопровождается контрлатеральным уменьшением количества опиатных рецепторов в заинтересованных областях. Эти наблюдения представляются весьма важными в свете имеющихся сведений, согласно которым добавочный зрительный путь взаимодействует с гипоталамусом и шишковидным телом. Полагают, что некоторые эффекты опиатов, в частности на эндокринную систему, могут осуществляться именно через опиатные рецепторы этого пути. В пределах таламуса опиатные рецепторы располагаются преимущественно в латеральной части медиальных и в интраламинарных ядрах. Кроме того, они обнаруживаются в перивентрикулярных ядрах и в области поводков. В этой связи можно отметить, что именно медиальные ядра таламуса являются интегрирующими центрами, обеспечивающими тип болевого ответа, который, как хорошо известно, находится под прямым влиянием опиатов.

Высокая плотность опиатных рецепторов в области воронки гипоталамуса, возможно, обусловлена тесной связью последней с задней долей гипофиза. Не исключено, что этот путь может иметь значение для регуляции биосинтеза или действия эндорфинов, синтезирующихся в этой части железы. Кроме того, большое количество опиатных рецепторов, выявленное в *locus coeruleus*, который содержит норадренергические нейроны, заставляют предположить, что опиаты могут вмешиваться в метаболизм биогенных аминов, включая норадреналин.

В спинном мозге опиатные рецепторы найдены в синапсах тонких миелинизированных и немиелинизированных волокон, ответственных за проведение сенсорной информации [Atweh S. F., Kuhar M. J., 1977]. Эти нервные волокна идут отдельным пучком в составе тракта Лиссауэра, оканчиваясь в маргинальной зоне и желатинозной субстанции. Здесь они образуют сложные ассоциативные связи с аксонами и дендритами нейронов спинного мозга, формируя так называемые гломерулы.

Сходная синаптическая организация наблюдается в области *ganglion trigeminale* (Gasser). Немиелинизированные нервные волокна выходят из мозга в составе V, VII, IX и X пар черепных нервов. Большинство из них заканчивает свой путь в желатинозной субстанции. На-

личие большой плотности опиатных рецепторов в желатинозной субстанции позволило высказать предположение, что обезболивающие эффекты опиатов могут осуществляться на уровне спинного мозга. Кроме того, высокая концентрация опиатных рецепторов в висцеральных афферентных волокнах, не несущих ответственности за проведение болевой чувствительности (блуждающий, языкоглоточный нервы), позволяет сделать предположение, что опиаты и сходные с ними соединения могут на уровне спинного мозга регулировать висцеральные эффекты, не связанные с анальгезией. В спинном мозге опиатные рецепторы, по-видимому, локализованы пресинаптически. Это заключение основывается на том, что их число значительно уменьшается при дорсальной ризотомии.

Как уже упоминалось выше, опиатные рецепторы не являются исключительным атрибутом модуляции синаптической передачи в ЦНС. Они найдены и интенсивно изучаются на периферии. В частности, удобными моделями для анализа взаимодействия опиатов и их аналогов с рецепторами являются препараты подвздошной кишки морской свинки, *vas deferens* мышей, кровеносные сосуды уха кролика и мигательная перепонка кошки [Eneko M. A., 1977; North R. A., Tonini M., 1977; Ronai A. Z., Berzetei I., 1978, и др.].

Действие опиатов на препарат прямой мышцы подвздошной кишки морской свинки обусловлено уменьшением продукции ацетилхолина в нервных окончаниях мезентериального (ауэрбахова) сплетения, которое иннервирует мышечные слои. Более подробные сведения указывают на то, что в нервном сплетении присутствует несколько типов нейронов, из которых только часть специфически взаимодействует с опиатами. Электрофизиологическими исследованиями установлено, что клетки мезентериального нервного сплетения можно разделить на три типа [North R. A., Tonini M., 1977]. К первому типу, согласно этой классификации, относятся нейроны, которые отвечают на фокальную стимуляцию возбуждающим постсинаптическим потенциалом. При внесении норморфина в среду инкубации 60% нейронов этого типа гиперполяризуются. Ко второму типу нейронов относятся клетки, у которых после потенциала действия возникает медленная гиперполяризация. Из них 10% гиперполяризуются при внесении морфина в среду инку-

бации. И
щие на
кальну
димости
двух ти
снимает
чувствит
щие на
бирова
но-мыш
пуляции
гибитори

Имею
типу кл
нейроны
пусть да
них, дост
что чере
эффект
рефлекс
альное с
цией, так
внесение
или неск

Рецеп
ки [Eneko
так как э
В то же
с опиатн
свинки. М
вается пр
втором —
существу
цепторов
ной пере
концентра
шение со
и снижает
стам. Бло
5,5-дитиоб
ствие мор
не оказыв
ниста при
опиатных

бации. К третьему типу относятся клетки, не реагирующие на прямую внутриклеточную деполяризацию, фокальную стимуляцию и на наркотик. Они, по всей видимости, являются глиальными клетками. Ответ первых двух типов нейронов носит дозозависимый характер и снимается налоксоном. Клетки первого типа наиболее чувствительны к норморфину. Полагают, что реагирующие на норморфин клетки этого типа отвечают за ингибирование наркотиком выделения ацетилхолина в нервно-мышечном синапсе. Не реагирующие клетки этой популяции, возможно, относятся к неадренергическим ингибиторным нейронам.

Имеются не прямые доказательства, что ко второму типу клеток относятся мезентериальные эфферентные нейроны. То, что часть из них реагирует на опиаты, пусть даже и при более высоких концентрациях последних, достаточно удивительно. Однако авторы полагают, что через эти нейроны осуществляется ингибирующий эффект опиатов на бессинаптический градуированный рефлекс. Возможно, что эффект опиатов на мезентериальное сплетение опосредуется не только гиперполяризацией, так как показано, что часть нейронов отвечает на внесение наркотика увеличением проводимости одного или нескольких ионов.

Рецепторы к морфину в мигательной перепонке кошки [Енего М. А., 1977] являются также специфическими, так как эффект агонистов снимается налоксоном на 80%. В то же время они менее чувствительны по сравнению с опиатными рецепторами подвздошной кишки морской свинки. Максимальный эффект в первом случае развивается при концентрации морфина порядка 1 мкМ, во втором — уже при концентрации 0,4 мкМ. Между тем существует ряд сходных параметров в отношении рецепторов мозга, мезентериального сплетения и мигательной перепонки глаза кошки. В частности, уменьшение концентрации Na^+ в среде, так же, как, напротив, повышение содержания Mn^{+2} увеличивает эффект морфина и снижается аффинитет связывающих мест к антагонистам. Блокаторы сульфгидрильных групп, такие, как 5,5-дитиобис (2-нитробензойная кислота), снижают действие морфина при высоком содержании Na^+ в среде и не оказывают существенного влияния на действие агониста при снижении концентрации этих ионов. Наличие опиатных рецепторов в синапсах нервных окончаний,

иннервирующих мигательную перепонку, свидетельствует, что опиаты или эндогенные пептиды с морфиноподобной активностью модулируют проведение нервных импульсов в системах с норадренергической регуляцией. В частности, морфин в концентрации 1 мкМ уменьшает высвобождение норадреналина и сокращение изолированной медиальной мышцы мигательной перепонки кошки, вызываемое электрической стимуляцией нерва. В то же время, если сокращение данного препарата достигалось добавлением экзогенного норадреналина, морфин не оказывал влияния на этот процесс.

Удобной моделью для изучения взаимодействия опиатов со специфическими рецепторами являются также гибридные линии клеток нейробластомы X глиомы (NG 108-15, синоним — 108CC15). Эта клеточная культура по многим биохимическим параметрам напоминает нормальные нейроны, содержит значительное количество опиатных рецепторов, изменяющих свой аффинитет к агонистам и антагонистам в присутствии Na^+ и, более того, позволяет на клеточном уровне моделировать состояния физической зависимости от наркотиков и абстиненцию.

Заканчивая рассмотрение вопроса о локализации рецепторов опиатов в организме, следует отметить, что, кроме нервной ткани, насыщаемое связывание и высокий аффинитет к $[^3\text{H}]$ -налоксону и $[^3\text{H}]$ -дигидроморфину обнаруживают в мембранной фракции клеток печени и почек морских свинок. В почках указанная активность определяется в значительно большей степени в корковом слое по сравнению с мозговым веществом этого органа. В небольшом количестве насыщаемое связывание регистрируется также в жировых клетках, поперечнополосатых мышцах и яичках. Наличие такого рода рецепции видоспецифично. В то время как в почках кроликов они в количественном отношении близки к определяемым у морских свинок, в печени и почках крыс и телят насыщаемое связывание опиатных агонистов и антагонистов регистрируется в незначительной степени [Simantov R. et al., 1978]. Стереоспецифическое связывание опиатов выявлено также на мембранах эритроцитов человека. Величина $K_{\text{дисс.}}$ опиатов с данными рецепторами составляет 9×10^{-9} М. Связывание тормозится Ca^{2+} и Na^{+} , а также фосфолипазой А и трипсином. Редуцирует связывание агонистов с рецептором и налок-

сон. Отмечается, что у наркоманов, употребляющих героин, специфическое связывание опиатов с эритроцитами увеличивается более чем на 43% [Aboed L. G. et al., 1976]. Еще одна интересная находка связана с обнаружением специфической рецепции β -эндорфинов на мембранах циркулирующих лимфоцитов человека [Nazim E. et al., 1979]. Строго говоря, эти рецепторы в полном смысле нельзя назвать опиатными, так как ни агонисты, ни антагонисты и даже природные энкефалины с ними не взаимодействуют. В общепризнанном же плане это сообщение заслуживает очень пристального внимания. Нет сомнения в том, что эндорфины и энкефалины, открытые как эндогенные лиганды опиатных рецепторов, выполняют в организме многочисленные, еще не исследованные функции.

Филогенез и онтогенез опиатных рецепторов. Анализ распределения опиатных рецепторов у животных различных типов и видов представляет также несомненный интерес. С одной стороны, подобные исследования способствуют дальнейшей разработке эволюционного учения; с другой — они позволяют обнаружить оптимальные адекватные модели для молекулярно-биологических исследований взаимоотношений между опиатными рецепторами и их экзогенными и эндогенными лигандами. К сожалению, до настоящего времени не производился подробный анализ филогенетического распределения известных сейчас типов опиатных рецепторов. Не исследовались и функциональные особенности этой гетерогенной по структуре и свойствам регуляторной системы организма. Вместе с тем несомненно, что выполненные в этом плане работы С. В. Pert и соавт. (1974) в достаточной степени интересны и создают основу для дальнейшего изучения филогенеза опиатных рецепторов. Эти исследователи изучали стереоспецифическое связывание [^3H]-дигидроморфина у различных животных (табл. 1).

Можно видеть, что у беспозвоночных (стереоспецифическое связывание опиатов определялось в выделенных нервных ганглиях) отсутствовали макромолекулы, обладающие аффинитетом к дигидроморфину. Напротив, нервная система всех изученных позвоночных животных содержала рецепторы, комплементарные этому опиату. Характерно, что в данных экспериментальных условиях не удалось отметить какой-либо выраженной закономерности в концентрации рецепторов для дигидроморфина

Уровень опиатных рецепторов в филогенезе

Т а б л и ц а 1

Животные	Стереоспецифическое связывание [³ H]-дигидроморфина (фемтомоль на 1 мг ткани)
Беспозвоночные	
Ленточные гельминты	
Schistosoma mansoni	0,2
Schistosoma japonicum	0,2
Моллюски	
Gastropoda (улитка)	0,2
Cephalopoda (кальмар)	0,2
Членистоногие	
Ракообразные	
речной рак	0,2
краб	0,2
Насекомые	
москит	0,2
таракан	0,2
Пауки (тарантул)	0,2
Позвоночные	
Круглоротые	3,9
Хрящевые рыбы	
колючая акула	0,8
гладкая акула (диэнцефалон)	1,8
Костистые рыбы (золотая рыбка)	2,0
Амфибии (жаба)	1,3
Рептилии (черепаха)	2,9
Птицы (цыпленок)	0,8
Млекопитающие	
крыса	2,5
мышь	1,6
обезьяна (фронтальное поле)	1,2
человек (фронтальное поле)	1,5

в ряду менее и более организованных позвоночных. Максимальное количество связывающих мест для опиата обнаружено у круглоротых, несколько меньше — у рептилий.

Из млекопитающих концентрация стереоспецифических мест связывания больше у крыс, а у мышей, обезьяны и человека она имеет близкие значения. Установлено, что $K_{дисс.}$ стереоспецифического связывания [³H]-дигидроморфина у колючей акулы, черепахи, 2-дневных цыплят и половозрелых мышей имеют близкие значения

и колебл.
финитет
позвоноч

Данн
торых а
специфи
цепторам
агонисто
левалло
фан, изо
личий в
зывания
не обнару
бенности
торов к
обезьян,
определя
фическое
опиатных
угольник
бок и цы
гидромор
определя
является
млекопит
сконцент
в област
ры преим
мозга, к
органом.

В это
люции л
ся из уча
ной обла
Это прям
кого уро
ме крыс
зонах ак
низших п
в област
пульсы. Р
опиаты м
фармакол
ей и опре

и колеблются между 2 и 3 нМ. Это указывает, что аффинитет к дигидроморфину опиатных рецепторов у этих позвоночных практически идентичен.

Данное заключение подтверждено и опытами, в которых анализировалась возможность ингибиции стереоспецифического связывания [^3H]-дигидроморфина с рецепторами мозга мышей, рыб и черепах под действием агонистов и антагонистов опиатов, включая налоксон, леваллорфан, декстраллорфан, леворфанол, декстрорфан, изоформы метадона и меперидин. Выраженных отличий в торможении специфического рецепторного связывания у разных широкодивергентных видов животных не обнаружено. В то же время отмечены некоторые особенности в распределении опиатных рецепторов (рецепторов к [^3H]-дигидроморфину) у позвоночных. Так, у обезьян, людей и крыс не регистрировалось совсем или определялось в очень малых количествах стереоспецифическое связывание в мозжечке. Высокая концентрация опиатных рецепторов выявлена в обонятельном треугольнике у человека и *bulbus olfactorius* золотых рыбок и цыплят. Стереоспецифическое связывание [^3H]-дигидроморфина у цыплят в значительных количествах определяется в архистриатуме, который, как известно, является предшественником миндалевидного ядра у млекопитающих. У золотых рыбок опиатные рецепторы сконцентрированы в вентральной части среднего мозга в области покрышки, в то же время у акул эти рецепторы преимущественно располагаются в районе переднего мозга, который почти целиком является обонятельным органом.

В этом плане интересно отметить, что в процессе эволюции лимбическая система млекопитающих развивается из участков мозга, имеющих отношение к обонятельной области более низкоорганизованных позвоночных. Это прямо указывает на филогенетическую связь высокого уровня опиатных рецепторов в лимбической системе крысы, мыши, обезьяны и человека и обонятельных зонах акул, золотых рыбок и цыплят. По-видимому, у низших позвоночных опиатные рецепторы располагаются в областях мозга, которые интегрируют болевые импульсы. В то же время возможно, что у этих животных опиаты могут вызывать отличные от млекопитающих фармакологические эффекты, не связанные с анальгезией и определяющиеся высоким содержанием специфиче-

ских рецепторов в областях мозга, контролирующих другие функции.

В связи с этим можно полагать, что подробное изучение особенностей рецепторного связывания опиатов и эндогенных лигандов в филогенетическом аспекте будет способствовать как уточнению локализации действия опиатов в ЦНС, так и решению вопроса о возможности физиологического расщепления эффектов опиатов, в частности анальгезии и наркотической активности.

Количество опиатных рецепторов варьирует в онтогенезе [Simon E. J., Hiller J. M., 1978]. При определении стереоспецифического связывания посредством инкубации гомогенатов мозга крыс с [^3H]-налтрексоном удалось показать (рис. 2), что опиатные рецепторы возникают внутриутробно и их присутствие в мозге регистрируется уже на 2-й неделе развития эмбриона. В то же время уровень связывания опиата у взрослых животных в 6—8 раз превышает таковой у новорожденных крысят. Быстрое повышение числа связывающих мест происходит в течение 3 нед постнатального развития и затем линейно возрастает до 20-й недели жизни крыс, когда количество опиатных рецепторов достигает уровня взрослых особей. Анализ кривых Скотчарда, проведенный в этих исследованиях, указывает, что повышение связы-

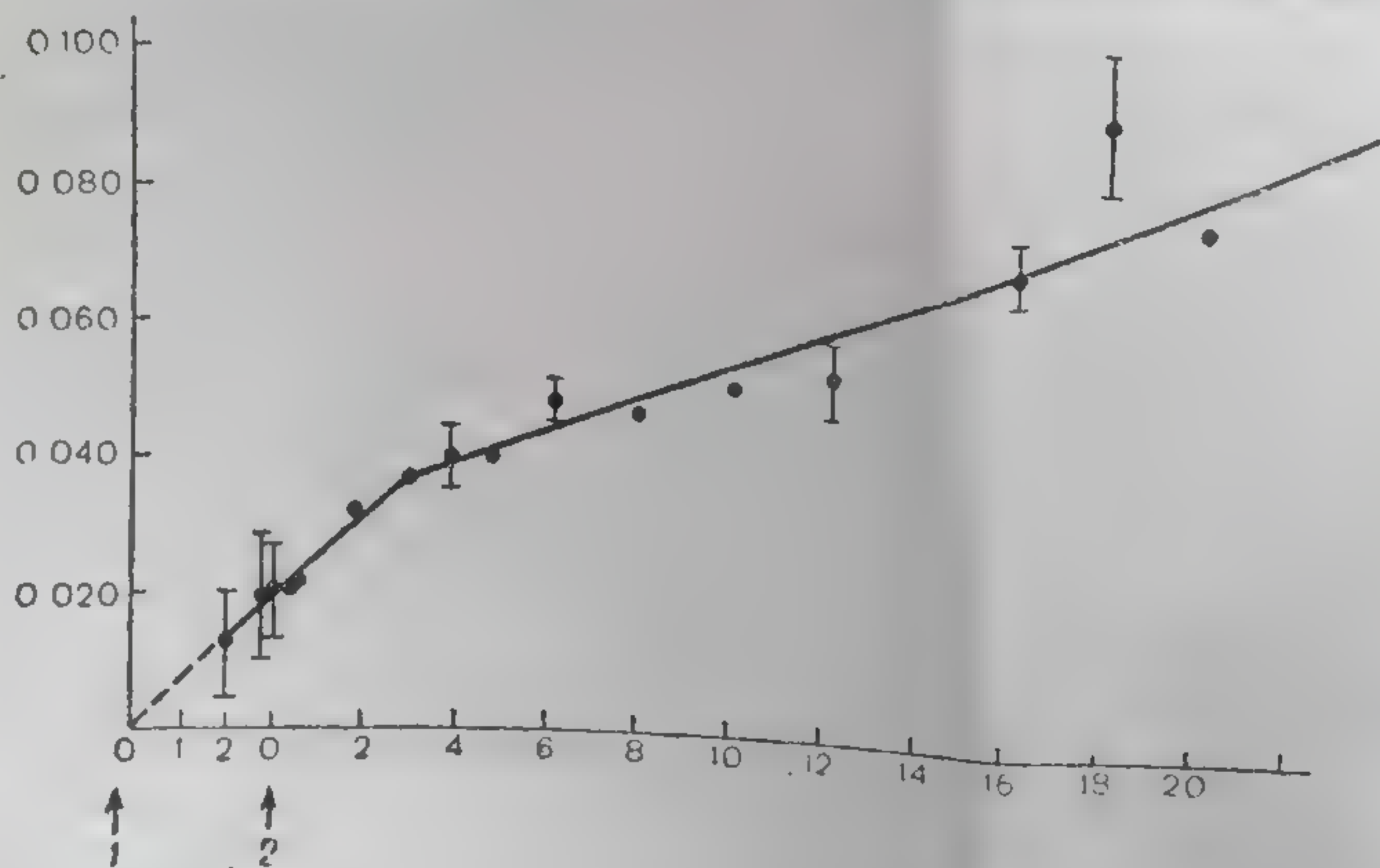


Рис. 2. Количество опиатных рецепторов мозга крыс в онтогенезе. На оси абсцисс — сроки эмбрионального (1) и постнатального (2) развития (в неделях); на оси ординат — связывание [^3H]-налтрексона (пМ/мг белка).

вания меченого лиганда у животных разных возрастов обусловлено только увеличением числа связывающих мест. Аффинитет же рецепторов к $[^3\text{H}]$ -налтрексону в процессе внутриутробного развития и в постнатальный период не меняется. Сходные результаты были получены и при изучении онтогенеза опиатных рецепторов у морских свинок, которые также появились в ткани мозга на поздней стадии развития плода. Авторы указывают, что увеличение числа опиатных рецепторов в онтогенезе в целом совпадает со степенью развития основных структур мозга — дендритов, синапсов и процессом миелинизации.

В исследованиях J. T. Coyle и C. B. Pert (1976) при использовании в качестве меченого лиганда $[^3\text{H}]$ -наллоксона было продемонстрировано, что возрастание числа специфических мест связывания антагониста не равнозначно в отдельных областях мозга. В частности, количество опиатных рецепторов у взрослых крыс значительно выше (в 6—8 раз) по сравнению с новорожденными животными в париетальной коре, таламусе и гиппокампе и менее значительно возрастает (лишь в 2—3 раза) в полосатом теле, гипоталамусе и продолговатом мозге. Важно отметить, что пренатальное введение морфина и налоксона на 15-е сутки беременности не сопровождается значительным изменением стереоспецифического связывания $[^3\text{H}]$ -наллоксона у новорожденных. Приведенные результаты заставляют, таким образом, предположить, что вариации числа рецепторов опиатов в онтогенезе могут определять выраженность фармакологического ответа на введение опиатов у животных разных возрастных групп. Не исключено, что при более тщательном анализе удастся найти и некоторые качественные отличия в действии опиоидных агонистов и антагонистов. Последнее может быть связано с неодинаковым по времени появлением различных популяций опиатных рецепторов, а также с временными особенностями формирования и физиологического созревания различных областей мозга.

Молекулярная организация и модели опиатного рецептора. Значительные вариации фармакологических свойств молекул опиатов при включении в их состав различных заместителей послужили основой для теоретических разработок моделей опиатного рецептора. Еще в 1954 г. A. Beckett и A. F. Casy предложили первую ги-

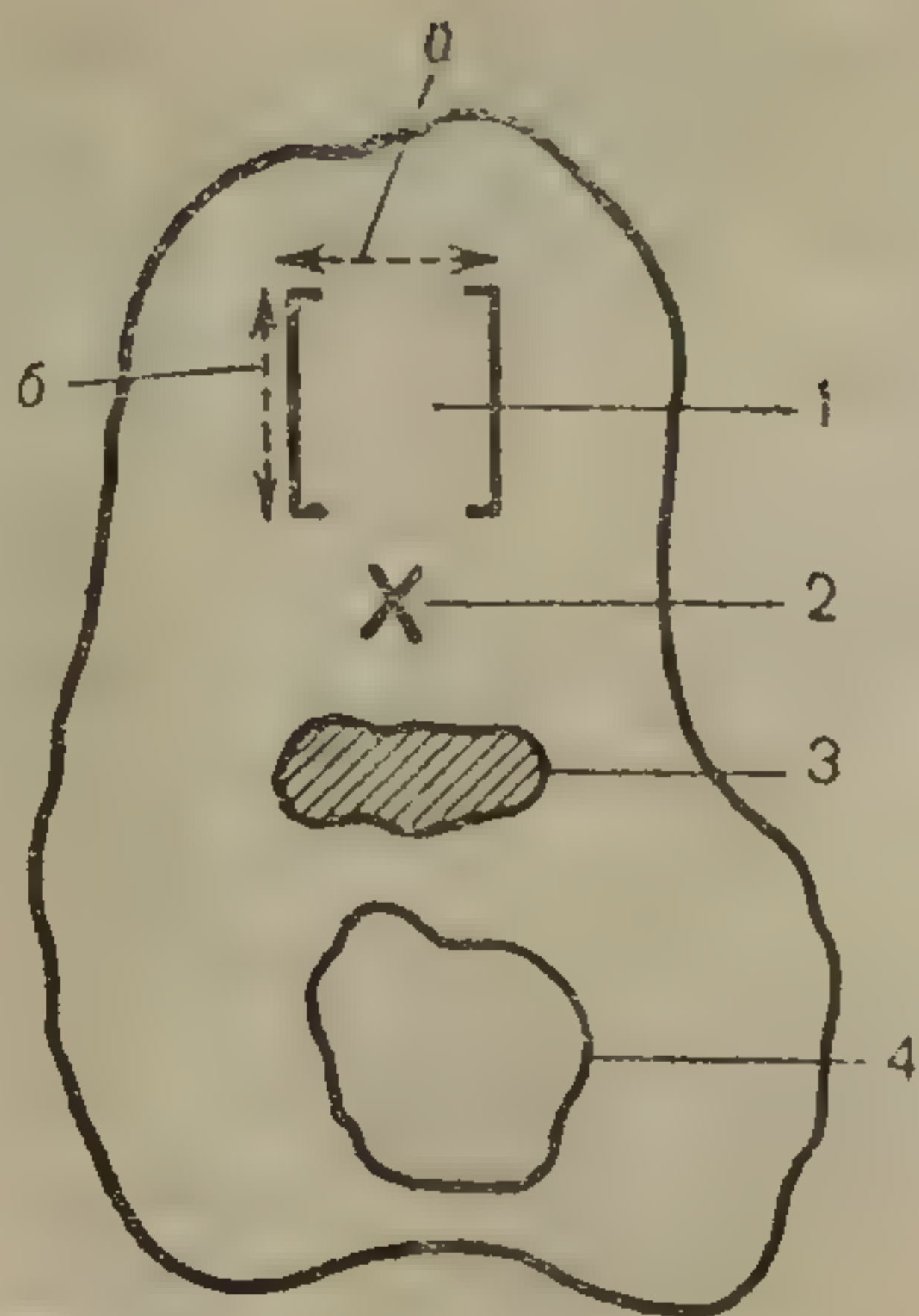


Рис. 3. Гипотетическая модель опиатного рецептора по А. Н. Вебекер и А. Ф. Кэси.

1 — анионный центр (a — примерно 0,75 нм; b — не менее 0,65 нм); 2 — фокус анионного заряда; 3 — углубление; 4 — плоский участок.

потетическую модель опиатного рецептора, в которой основная роль по связыванию лиганда отводилась атому азота пиперидинового кольца, взаимодействующего с анионным центром рецептора (рис. 3). Бензольное кольцо опиатов, согласно этой моде-

ли, за счет ван-дер-ваальсовых сил ассоциируется с плоским участком поверхности рецептора. Указанная модель явилась основой для экспериментального изучения значения различных функциональных групп в молекулах опиатов, ответственных за проявление биологического эффекта.

Несколько позже Р. С. Portoghesi (1965) экспериментально подтвердил, что атом азота имеет решающее значение в комплексовании анальгетика с активным участком рецептора. Вместе с тем в этой работе была впервые высказана мысль, что опиатные рецепторы либо имеют несколько степеней подвижности, либо существуют несколько типов этих рецепторов, в различной степени комплементарных отдельным опиатам.

Существование анионного центра рецептора также получило косвенное экспериментальное подтверждение, в связи с установлением собственной анальгетической активности у некоторых неорганических катионов при внутрижелудочковом введении. Действие последних блокировалось налоксоном [Harris R. A. et al., 1976]. При первых попытках идентифицировать субстрат, ответственный за связывание опиатов в тканях мозга, привлекли внимание молекулы цереброзидов, цереброзидсульфата и ганглиозидов [Loh H. H. et al., 1974]. Основываясь на молекулярной модели А. Вебекер и А. Ф. Кэси, авторы обнаружили структурную комплементарность некоторых гликолипидов к молекуле морфина. Более того, эти соединения являются оптически активными и, следовательно,

но, сп...
В силу...
ток, в...
мическ...
рецепт...

В с...
[Loh H...
продем...
образо...
в соста...
зид, це...
20—30...
ся стер...
ные де...
липосо...
шим аф...
ребрози...
торый...
ними т...

Важ...
атам к...
них. Та...
средств...
декстро...
локсона...
зывани...
ный по...
превыш...
следнег...
редь мо...
бирова...
локсона...
аналгет...
тивен, ч...

Кро...
наруже...
ском со...
ных опи...
тоду L...
кового...
по гекс...
зида по...
щих сво...
ена -те...

но, способны к комплементарному взаимодействию. В силу своей локализации в мембранах нервных клеток, в том числе и в нервных окончаниях, указанные химические соединения также могут выполнять функцию рецепторных молекул.

В серии работ, вышедших из этой лаборатории [Loh H. H. et al., 1975, 1978; Cho T. M. et al., 1975], продемонстрировано, что при использовании липосом, образованных из коммерческих препаратов цереброзида, в состав которого входят цереброзид, гидроксицереброзид, цереброзидсульфат и гидроксицереброзидсульфат, 20—30% [^3H]-налоксона или [^3H]-эторфина связываются стереоспецифически. Характерно, что сульфированные дериваты составили 10—15% от всего материала липосом и именно они, как оказалось, обладают наивысшим аффинитетом к опиатам. Гидроксицереброзид и цереброзид имели меньшее сродство к опиатам, хотя некоторый уровень стереоспецифического взаимодействия с ними также определялся.

Важно отметить, что аффинитет цереброзидов к опиатам коррелирует с аналгетической потенцией последних. Так, леворфанол почти в 10 000 раз имеет большее сродство к цереброзидам липосом, чем его энантиомер декстрорфан, судя по ингибции связывания [^3H]-налоксона и в 1000 раз — при определении ингибции связывания [^3H]-эторфина. Аффинитет эторфина, измеренный по ингибции связывания [^3H]-эторфина в 200 раз превышает таковой морфина и 13-кратно был выше последнего при вытеснении [^3H]-налоксона. В свою очередь морфин в большей степени, чем леворфанол, ингибировал связывание как [^3H]-эторфина, так и [^3H]-налоксона. В этой связи необходимо отметить, что по своей аналгетической способности морфин в 7 раз более активен, чем леворфанол, при введении в желудочки мозга.

Кроме того, помимо свойства связывать опиаты, обнаружены некоторые общие закономерности в химическом составе цереброзидов и фракции частично очищенных опиатных рецепторов, выделенных из мозга по методу L. I. Lowpey и соавт. (1974). Это касается одинакового содержания азота аминокрупп в эквивалентных по гексозе препаратах опиатного рецептора и цереброзида после кислотного гидролиза. На основании ряда общих свойств рецептора опиатов и цереброзидов построена теоретическая модель, демонстрирующая возмож-

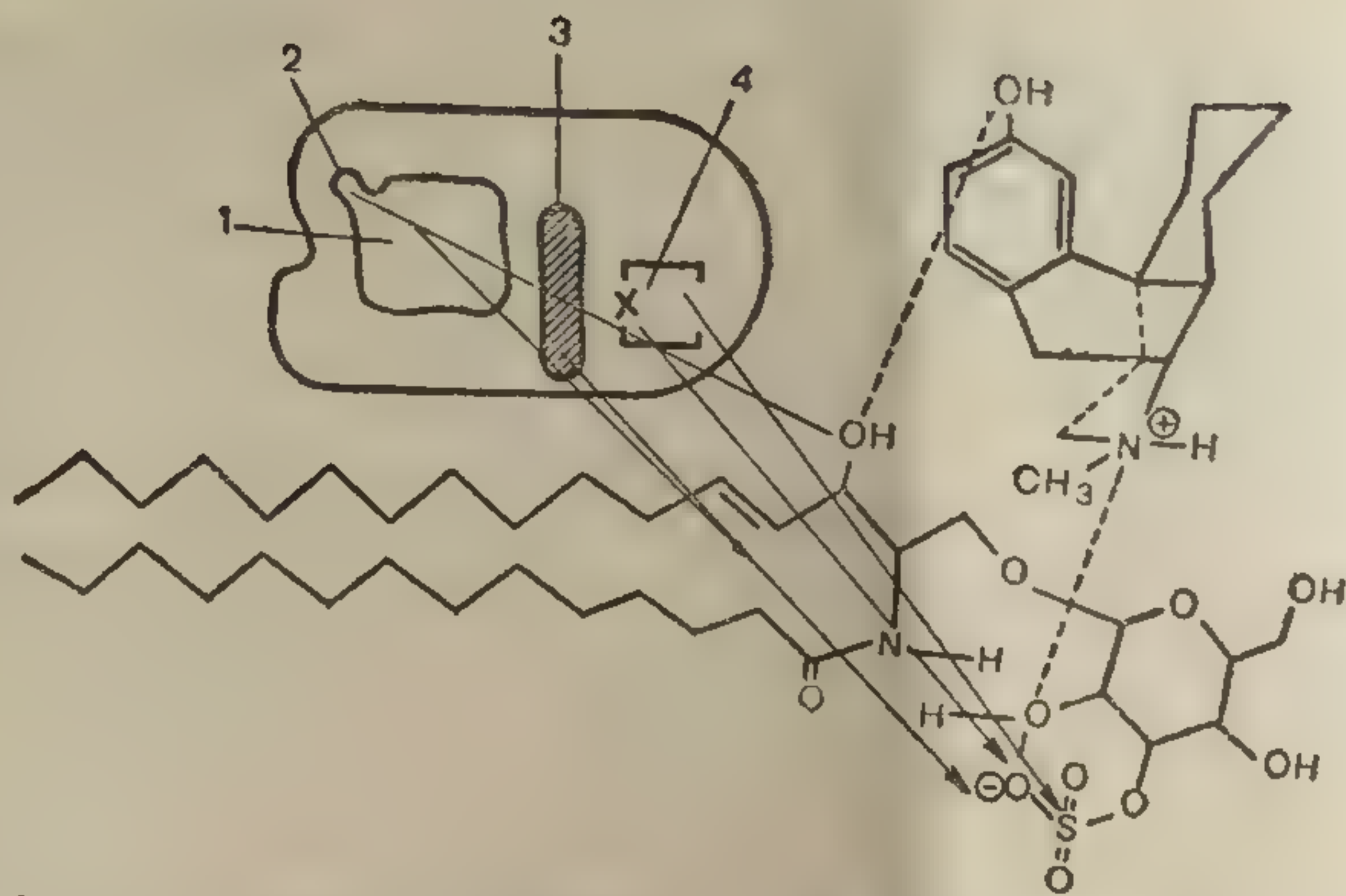


Рис. 4. Участки взаимодействия опиата с молекулярной моделью цереброзидсульфата по сравнению со схемой опиатного рецептора. 1 — плоская поверхность; 2 — фенольный участок; 3 — впадина; 4 — плоский участок.

ность стереоспецифического взаимодействия опиатов с цереброзидсульфатом (рис. 4).

Согласно предложенной модели, жесткая структура молекулы опиатов, в частности леворфанола, может при близком контакте с молекулой цереброзидсульфата способствовать конформационным изменениям последнего с образованием комплементарной опиату конфигурации. Видно, что выявляемые места связывания имеют большое сходство с предшествующей моделью А. Beckett и А. F. Casy.

Взаимодействие опиата с цереброзидсульфатом, согласно новой модели, происходит следующим образом: фенольная группа с высокой полярностью реагирует с комплементарной частью керамидного хвоста, который благодаря наличию π -связей также имеет высокую полярность. Это взаимодействие обеспечивается ван-дер-ваальсовыми связями, сила которых, как известно, пропорциональна поляризованности составляющих химических группировок. Карбоксильная группа фенольного кольца посредством водородных связей притягивается к карбоксильной группе керамидного хвоста молекулы. Пиперидиновое кольцо, перпендикулярное плоскости молекулы, занимает пространство между керамидным концом и галактозной группой цереброзидсульфата, удерживаясь в этом положении благодаря наличию гидрофобных связей и образованию электростатического

взаимо
онной

Зак
фат ре
в ЦНС
показа
сомнен
церебро
вания
при ис
генетич
ге цере
и ганг

тельны
доза эт
явленну
мальны
атам уд
ным бе
азур А
рующие
доза мо
ветстве
ненно,
сульфат
опиатов

Выш
экспери
висимая
локсона
вии азу
морфин
концент
Скетчар
фически
что кол
тельно
ных из
розидам
ребрози
атного

Необ
ганизма
происхо

взаимодействия между протонированным азотом и анионной сульфатной группой цереброзидсульфата.

Закономерен вопрос: в какой степени цереброзидсульфат реально выполняет функцию опиатного рецептора в ЦНС? Ответ на него далеко не однозначен, как может показаться на первый взгляд. Существуют данные, с несомненностью свидетельствующие о важном значении цереброзидсульфата в обеспечении рецепторного связывания в организме [Loh H. H. et al., 1975, 1978]. Так, при использовании в эксперименте мутантных мышей с генетически обусловленным низким содержанием в мозге цереброзидов, но нормальным уровнем фосфолипидов и ганглиозидов оказалось, что они весьма не чувствительны к аналгетическому эффекту морфина. Средняя доза этого аналгетика в 11 раз превышала таковую, выявленную при оценке обезболивающего действия на нормальных животных. Повышения резистентности к опиатам удавалось достигнуть и в том случае, когда животным без генетического дефекта предварительно вводили азур А или цетилинридин хлорид, специфически блокирующие цереброзидсульфат. Средняя анальгезирующая доза морфина в этих экспериментах повышалась соответственно для каждого блокатора в 3 и 8 раз. Несомненно, эти опыты подтверждают участие цереброзидсульфата в обеспечении фармакологических эффектов опиатов.

Вышеприведенные данные были подтверждены и в экспериментах *in vitro*, когда была обнаружена дозозависимая ингибция связывания [^3H]-морфина и [^3H]-налоксона синаптосомальной фракцией мозга в присутствии азура А. Характерно, что ингибция связывания морфина различалась при повышении в среде инкубации концентрации ионов Na . Кроме того, анализ кривых Скетчарда продемонстрировал уменьшение числа специфических мест связывания опиатов. Установлено также, что количество специфических мест связывания значительно уменьшено в препаратах синаптосом, выделенных из мозга мутантных мышей, дефицитных по цереброзидам. Все это дополнительно подтверждает, что цереброзидсульфат может быть одним из компонентов опиатного рецептора.

Необходимо отметить, что в условиях целостного организма взаимодействие цереброзидсульфата с опиатами происходит на границе взаимодействия фазы липид/во-

да. Эта особенность моделируется экспериментально при создании *in vitro* двухфазной системы гептан/вода. Установлено, что $K_{асс.}$ опиатов с цереброзидсульфатом в водной фазе соответствует таковому, найденному для связывания наркотиков с очищенной фракцией опиатного рецептора мозга. Причем $K_{асс.}$, определенная для связывания наркотика в гептане по порядку аналогична $K_{асс.}$ опиатов с рецептором в целых гомогенатах тканей мозга. Определение полумаксимальных ингибирующих доз различных опиатов показало полное соответствие этого параметра в водной фазе с анальгетической активностью опиатов в условиях их введения в кровяное русло. В то же время ID_{50} опиатов в гептане имеют значения, близкие к найденным для соответствующих опиатов при внутрижелудочковом введении по критерию развития анальгезии. Данные результаты хорошо согласуются с представлением, согласно которому при внутрижелудочковом способе введения препарат попадает в более липидную фазу. Можно полагать, что большее сродство к цереброзидсульфату агонистов по сравнению с антагонистами объясняется значительной гидрофобностью последних.

Эти наблюдения послужили основанием для разработки метода оценки агонистических и антагонистических свойств опиатов с использованием цереброзидсульфата в качестве модельного аналога опиатного рецептора [Cho T. M. et al., 1976]. При внесении [3H]-цереброзидсульфата в систему гептан/вода он транспортируется с определенной скоростью из водной фазы в органическую. Этот процесс ускоряется при добавлении в систему немеченых агонистов и (в меньшей степени) антагонистов опиатов. Увеличение скорости перемещения цереброзидсульфата в гептановую фазу под действием леворифана нивелируется налоксоном, который сам по себе не влияет на транспорт гликолипида. Частичные агонисты и антагонисты (препараты со смешанными свойствами) вызвали двойственный эффект: в малых дозах они задерживали транспорт цереброзидсульфата, в больших же концентрациях ускоряли свой собственный транспорт. Весьма интересно, что переход цереброзидсульфата из водной фазы в органическую стимулируют некоторые катионы, способность которых к этому влиянию убывает в следующей последовательности: $La^{3+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > K^+ > Na^+ > Li^+$. Активирующий эф-

фект Ca^{2+} в присутствии последних в водной фазе, в последнем случае, в церебро-

С а...
церебро...
ствием...
венно...
вия кат...
многие...
 La^{3+} в...
[Harris...
внутри...
аналгез...
ся внут...
ным вве...
морфину...
рующем...
шей явл...
имеются...
 Ca^{2+} в м...
ет эффе...
уменьше...
му под...

Сущес...
ствия La^{3+} ...
новывает...
му La^{3+} ...
биологи...
ления ак...
ние роли...
заклуча...
деленны...
чено, что...
реброзид...
гезии су...
ный вбли...

В по...
цептора...
тельств...
сульфат...
изоэлект...
геле в си...

фект Ca^{2+} на транспорт цереброзидсульфата уменьшается в присутствии моновалентных катионов. На наш взгляд, последние наблюдения, полученные на модельной системе, в еще большей степени подтверждают участие цереброзидсульфата в рецепторном связывании опиатов.

С аналогично выраженной стимуляцией транспорта цереброзидсульфата в органическую фазу как под действием La^{3+} , так и опиатов обнаружены явления, косвенно подтверждающие наличие тесного взаимодействия катионов с опиатными рецепторами. В частности, многие авторы фиксируют внимание на участии Ca^{2+} и La^{3+} в механизмах обезболивающего эффекта опиатов [Harris R. A. et al., 1975, 1976, и др.]. Введение La^{3+} внутрь желудочков мозга сопровождается развитием аналгезии у крыс и мышей. Данный эффект редуцируется внутрижелудочковой аппликацией Ca^{2+} или подкожным введением налоксона. Животные, толерантные к морфину, проявляют также толерантность к аналгезирующему эффекту La^{3+} , а у зависимых от морфина мышей явления абстиненции снимаются La^{3+} . Кроме того, имеются сведения, что морфин снижает концентрацию Ca^{2+} в мозге и хелатор этого катиона ЭГТА потенцирует эффект морфина. Инъекция налоксона препятствует уменьшению содержания кальция в мозге, происходящему под действием морфина.

Существует по крайней мере две возможности участия La^{3+} в механизмах обезболивания. Одна из них основывается на известном наблюдении, согласно которому La^{3+} является ингибитором транспорта Ca^{2+} через биологические мембраны за счет специфического подавления активности переносчика кальция. Второе объяснение роли La^{3+} в обеспечении обезболивающего эффекта заключается в возможности взаимодействия La^{3+} с определенными участками опиатного рецептора. Не исключено, что таким участком может быть и молекула цереброзидсульфата. Установлено, что в механизмах аналгезии существенное значение имеет только Ca^{2+} , связанный вблизи опиатного рецептора.

В пользу существования и других компонентов рецептора, специфически связывающих опиаты, свидетельствуют эксперименты с меченой по йоду йоддиазосульфаниловой кислотой. В этих опытах при помощи изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле в синаптических мембранах удалось выявить соеди-

нения с высоким аффинитетом к опиатам, в значительной степени отличающиеся от цереброзидсульфата.

Существуют и другие основания, не позволяющие всецело верифицировать цереброзидсульфат как опиатный рецептор. К ним, в частности, относится большее сродство к цереброзидсульфату агонистов по сравнению с антагонистами опиатов. В соответствии с предложенной моделью это не является неожиданным, так как радиус гидратированной группы при атоме азота, участвующий в электростатическом взаимодействии у агонистов меньше, чем у антагонистов. Хорошо известно, что в этом случае справедливо правило, согласно которому сила электростатического взаимодействия обратно пропорциональна радиусам протонированного атома азота опиатов (в нашем случае) и анионной сульфатной группы цереброзидсульфата.

Вместе с тем при интегральной оценке молекулярных систем мозга, способных специфически взаимодействовать с опиатами или сходными с ними соединениями, роль цереброзидсульфата как компонента, участвующего в подобном взаимодействии, игнорировать в настоящее время нет оснований. Весьма вероятно, что молекула цереброзидсульфата или его SO_4^{2-} -группа выполняет роль анионного центра более сложно организованного опиатного рецептора.

То, что опиатный рецептор представляет собой как морфологически, так и функционально неоднородную молекулярную структуру, свидетельствуют многие факты. При биохимической идентификации опиатных рецепторов была установлена их весьма интересная особенность изменения аффинитета к агонистам и антагонистам в зависимости от концентрации Na^+ в окружающей среде [Pert C. B. et al., 1973; Pert C. B., Snyder S. H., 1974, и др.]. При использовании в экспериментах физиологических концентраций натрия обнаружено, что при этом в значительной степени снижается связывание агонистов и увеличивается аффинитет рецепторов к опиатным антагонистам. В этом случае агонистические и антагонистические свойства молекул опиатов удается довольно четко дифференцировать. Молекулы со смешанными агонист-антагонистическими свойствами, такие, как налорфин или леваллорфан, в меньшей степени меняют аффинитет к опиатному рецептору, чем чистый антагонист налоксон при добавлении Na^+ .

Исходя из атомов со смешанным клиническим названием препарата как анальгетика опиатных рецепторов со смешанным действием в клинической практике исходя из фармакологической анальгезирующей способности препарата и антагонистического действия, блокаторов на рецепторы.

Естественным образом, обеспечивая доступ к лигандам. С. В. Pert, S. H. Snyder, гипотезу о конверсии интерконвертируемых антагонистических рецепторов в рецепторы концентрации. Схематически иллюстрирует эту концепцию, которую можно использовать в фармакологической концепции, позволяющей понять фармакологического

Отмеченная высокая аффинитет к опиатам под действием не является. Точно такие же свойства в отношении или других

Рис. 5. Антагонизм и агонистическая активность опиатного

Исходя из известных фактов, что антагонисты опиатов со смешанными свойствами, первым из которых был клинически апробирован налорфин (фирменное название препарата Nalline), могут с успехом применяться как аналгетики, и на основании вновь открытых свойств опиатных рецепторов был сделан вывод, что антагонисты со смешанными свойствами должны иметь предпочтение в клинической практике. Именно таким способом, исходя из особенностей опиатного рецептора, при физиологической концентрации в мозге Na^+ можно получить анальгезирующий эффект при введении минимальной дозы препарата. В последующем «натриевый индекс», т. е. способность менять аффинитет рецептора к агонистам и антагонистам опиатов в присутствии Na^+ и в его отсутствии, был предложен как наиболее простой и достоверный способ тестирования фармакологических препаратов на наличие агонистических и антагонистических свойств.

Естественно, возник вопрос о расшифровке механизмов, обеспечивающих различный аффинитет рецепторов к лигандам в зависимости от ионного состава среды. С. В. Pert, S. H. Snyder (1974) впервые сформулировали гипотезу о существовании опиатного рецептора в двух интерконвертируемых конформациях — агонистической и антагонистической. Последняя, исходя из реальной концентрации Na^+ в организме, представляется физиологической. Схема, предложенная S. H. Snyder (1975), иллюстрирует это положение (рис. 5). Согласно выдвинутой концепции, анальгезирующий эффект может возникнуть только тогда, когда рецептор находится в агонистической конформации. Именно этот факт является решающим, по мнению автора, в обеспечении фармакологического эффекта препаратов.

Отмеченная способность опиатного рецептора менять свой аффинитет к лигандам под действием ионов не является уникальной. Точно такие закономерности в отношении ионов или других «проводни-

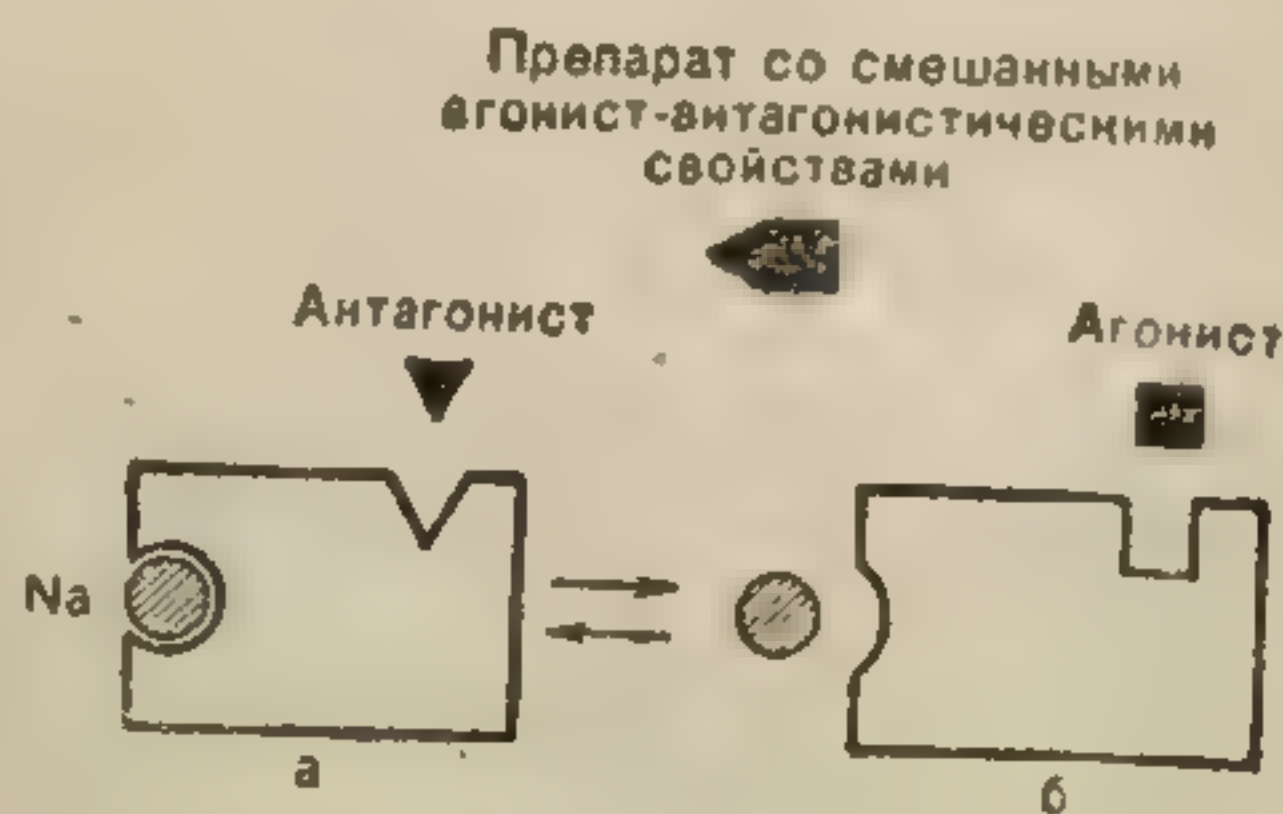


Рис. 5. Антагонистическая (а) и агонистическая (б) конформация опиатного рецептора.

ков» найдены при изучении мускариновых, глициновых и других рецепторов. S. H. Snyder полагает, что изменение специфических свойств рецепторов под действием ионов относится к фундаментальным механизмам, обеспечивающим распознавание нейромедиаторами функционального состояния постсинаптической мембраны. Думается, что этот вывод применим и к пресинаптическим мембранам, по крайней мере некоторые из них содержат опиатные рецепторы.

Следует отметить, что приведенная здесь модель S. H. Snyder весьма условна и схематична. Она иллюстрирует лишь основные конформационные особенности опиатного рецептора. Вместе с тем сама проблема настолько важна и значительна, что требует дальнейшей разработки и тщательного анализа. Подобная попытка была сделана E. J. Simon и J. Groth (1975), а также E. J. Simon и I. M. Hiller (1978), исследовавшими кинетику инактивации опиатного рецептора сульфгидрильными реагентами для уточнения конформационных изменений опиатного рецептора. Установлено, что последние очень быстро теряют способность специфически взаимодействовать с опиатами при действии N-этилмалеймида, йодацетата и т. д. Авторы выяснили, что такая инактивация в значительной степени может быть устранена добавлением в инкубационную систему специфического лиганда (например, налтрексона). Базируясь на этом факте, можно полагать, что, по-видимому, SH-группы, подвергаемые алкилированию, находятся вблизи специфического места связывания лиганда и экранируются при формировании рецепторного комплекса.

Несколько неожиданным явилось наблюдение, что свойством замедлять инактивацию опиатного рецептора сульфгидрильными реагентами обладает также и Na^+ . Добавление NaCl в инкубационную систему продлевало полупериод инактивации рецептора с 8 до 30 мин. Как правило, Na^+ не влияет на процесс алкилирования SH-группы, и выявленные закономерности, вероятнее всего, обеспечиваются конформационными изменениями опиатного рецептора под влиянием ионов натрия. Анализ участия других ионов в этом процессе подтвердил специфичность эффекта Na^+ на задержку инактивации рецептора. Объясняя полученные данные, авторы предложили собственную модель аллостерического изменения опиатного рецептора (рис. 6). Согласно их предполо-

Рис. 6. Мо-
стерического
 Na^+ на ко-
опиатного

жению, р-
димера. С
подразуме
против, пр
нимать ко
ния агони
действием
нием топо
новятся м
Диссоциир
и не изме
При опред
ция олиго
стичность
его аффин
ловиях.

Открыт
рецептора
гонистам п
взаимодейс
Определен
получила м
1976]. Авт
представите
включая об
место поса
ской ассоци
(рис. 7).

В рамка
взаимодейс
следующим
ментарно л
сток, свобод
мации реце
группы. Сп
взаимодейс
7-[1-фенил-3
ин (ФЭТ), з
В связи с эт

Рис. 6. Модель аллостерического влияния Na^+ на конформацию опиатного рецептора.



жению, рецептор может иметь структуру олигомера и димера. Связывание антагонистов в присутствии Na^+ подразумевает кооперацию олигомеров рецептора. Напротив, при отсутствии Na^+ в среде димер может принимать конформацию, предпочтительную для связывания агонистов. Изменение конформации димера под действием Na^+ в свою очередь сопровождается смещением топографии сульфгидрильных групп, которые становятся менее уязвимыми в химическом отношении. Диссоциированный олигомер устойчив к действию Na^+ и не изменяет в присутствии иона свою конформацию. При определенных условиях происходит реполимеризация олигомеров в димер. Полагают, что подобная пластичность опиатного рецептора способствует регуляции его аффинитета в изменяющихся физиологических условиях.

Открытие двух взаимопереходных форм опиатного рецептора с высоким аффинитетом к агонистам и антагонистам послужило основой для работ, моделирующих взаимодействие лигандов с опиатными рецепторами. Определенное признание у различных исследователей получила модель S. H. Snyder [Feinberg A. P. et al., 1976]. Авторы постулировали, что в рецепторе опиатов представляют несколько связывающих участков, включая область липофильного взаимодействия (Л), место посадки аминогруппы (А) и области специфической ассоциации агонистов (АГ) и антагонистов (АНТ) (рис. 7).

В рамках предложенной модели конформационные взаимодействия опиатов с рецептором представляются следующим образом. Кольцо А этих молекул комплексно липофильному участку рецептора, ионный участок, свободный для взаимодействия при любой конформации рецептора ассоциируется с атомом азота аминогруппы. Специфическое место связывания агонистов взаимодействует с кольцом В таких производных, как 7-[1-фенил-3-гидроксипропил-3]-эндоэтенотетрагидротетрабензин (ФЭТ), этонитазен, феназоцин и фентанил, которые в связи с этим являются чрезвычайно сильными агони-

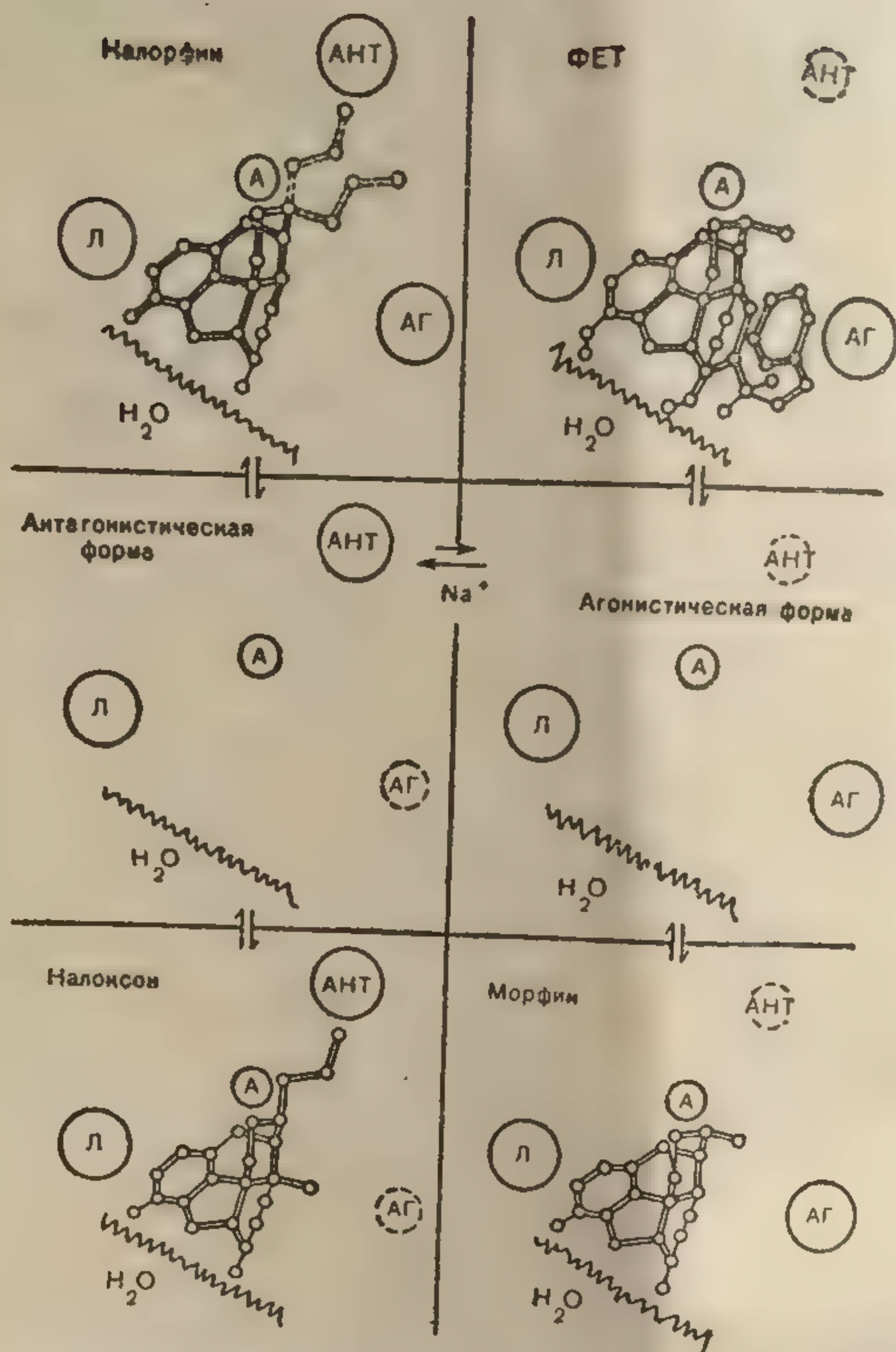


Рис. 7. Молекулярная модель опиатного рецептора по S. H. Snyder. Рецептор показан в двух взаимопереходных конформациях, аллостерически изменяющихся под действием Na⁺.

стами. Связывание агонистов в свою очередь стабилизирует агонистическую конформацию рецептора. В то же время этот участок функционально не активен, когда рецептор находится в антагонистической конформации. По-видимому, последняя и характерна для свободного рецептора в нормальных физиологических условиях, так как в мозге доминирует Na⁺.

Агонисты, в молекулах которых отсутствует кольцо F, такие, как морфин, несколько иначе взаимодействуют с опиатным рецептором. В этом случае вначале

происходит
но кольца
тор перехо
ществляет
цептором.
соответстви
активны в
нии антаго
ки на реце
ной группы
N-циклобут
стабилизи
тора. В час
ры модели,
локсона ли
стабилизи
ределяет в
соединения.
здесь, напр
способствует
свойств. Во
ствует и ги
родного ат
ируется с г
но, что гид
ществляет
проецируя
ток рецепто
нистических
гидроксиль
группы, как

Другая
была предл
ции, отстаи
вания анта
ние конформ
полагает, чт
модели S. H
вующего с
спорно. Доп
нии принадл
пам специф
ходится реш
мой S. H. S

происходит комплементарная ассоциация соответственно кольца А и азота аминогруппы. В результате рецептор переходит в агонистическую конформацию и осуществляется дальнейшее взаимодействие опиата с рецептором. Молекулы агонистов, лишенные кольца F в соответствии с разбираемой моделью, фармакологически активны в значительно меньшей степени. При связывании антагонистов, специфическое для них место посадки на рецепторе реагирует с π -электронами N-аллильной группы или с атомами N-циклопропилметильной или N-циклобутилметильной групп. Такое взаимодействие стабилизирует антагонистическую конформацию рецептора. В частности, именно поэтому, как полагают авторы модели, способность 14-й гидроксильной группы налоксона лимитировать ротацию N-аллилбоковой цепи и стабилизировать ее в экваториальной конформации определяет выраженные антагонистические свойства этого соединения. Что касается налорфина и пентазоцина, то здесь, напротив, выраженная ротация этой цепочки способствует проявлению антагонист-агонистических свойств. Во взаимодействии с опиатным рецептором участвует и гидроксильная группа асимметрического углеродного атома, благодаря которой кислород ассоциируется с гидрофильной частью рецептора. Не исключено, что гидроксил асимметричного атома углерода осуществляет водородную связь с кислородом C-кольца, проецируя R₁- и R₂-заместители на гидрофобный участок рецептора. Видимо, этим объясняется снижение агонистических свойств молекул при замещении фенольных гидроксильных групп в кольце А морфина на менее гидрофобные группы, как это имеет место в кодеине.

Другая молекулярная модель опиатного рецептора была предложена V. M. Kolb (1978). Согласно концепции, отстаиваемой этой исследовательницей, для связывания антагонистов и агонистов не обязательно изменение конформации самого рецептора. В частности, автор полагает, что определение аминосвязывающего места в модели S. H. Snyder как ионного центра, взаимодействующего с азотом аминогруппы, в достаточной степени спорно. Допуская, что активная роль в этом связывании принадлежит положительно заряженным аминогруппам специфического участка опиатного рецептора, приходится решать ряд проблем, не согласующихся со схемой S. H. Snyder. Так, при pK_a морфина, равной 7,88,

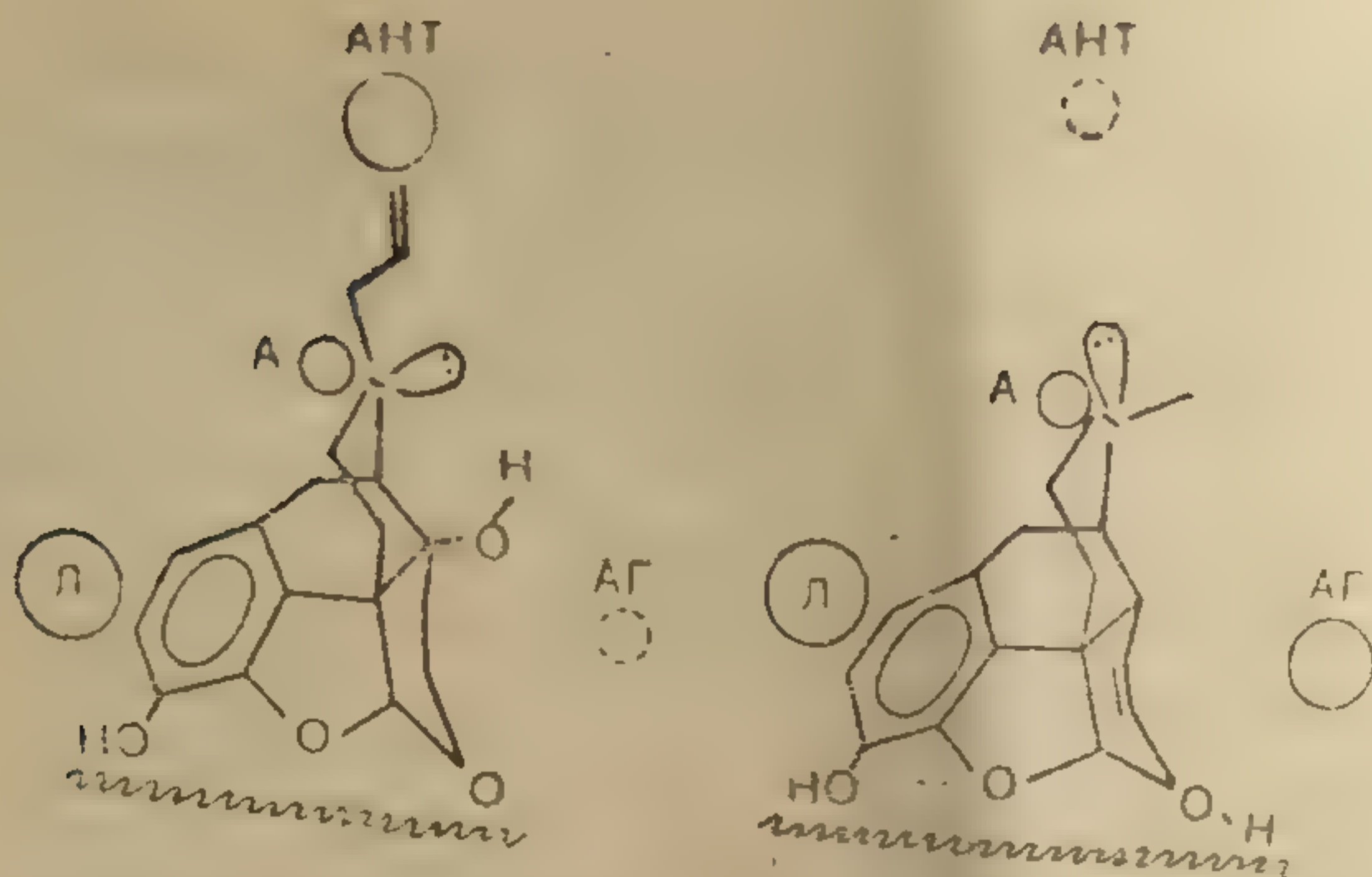


Рис. 8. Направление неподделенной пары электронов при связывании с опиатным рецептором агониста и антагониста в модели, предложенной S. H. Snyder.

Слева — связывание налоксона с рецептором, находящимся в антагонистической конформации. Справа — связывание морфина с рецептором в агонистической конформации.

его молекула при физиологических значениях pH протонируется на 80%. Естественно, в этом случае взаимодействие данного наркотика с аминосвязывающим местом модели S. H. Snyder будет проблематичным. Логичнее, по мнению V. M. Kolb, предположить, что как раз непротонированные аминогруппы фактически являются активными элементами организации аминосвязывающего места на рецепторе.

Далее в молекулярной модели S. H. Snyder при взаимодействии налоксона с рецептором, находящимся в антагонистической конформации, неподделенная пара электронов атома азота направлена в противоположную сторону от аминосвязывающего места (рис. 8). Если бы все же взаимодействие в этом случае и было химически возможным, то лишь только как слабый и противоречивый процесс. В данном случае, считает V. M. Kolb, предлагаемая модель выглядит не логичной. Не совсем ясны и основания для выбора определенных конформаций опиатных молекул, иллюстрирующих их ассоциацию с предлагаемой моделью рецептора. Так, морфин, оксиморфин и леворфанол изображаются S. H. Snyder в конформациях, когда N-метильная группа находится в аксиально-кресельной конформации. Между тем конформация этих соединений, в которых N-метильная группа расположена в экваториально-кресельной конформации, термодинамически более стабильна. Энергетические раз-

личия, со-
снальной
ют меньш
ально вз
и соавт.
цию нало
показать,
влияет на
как раз
сельной о
кольцо мо
нимает фо
этом нахо
ее стериче
звояет го
налоксона,
следовател

Резонно
лярная фо
цией пипер
N-аллильн
жении, вза
ным рецепт
имодействи
что в этом
атома азот
нию, прохо
V. M. Kolb
антагонист
направлени
направлени
азота, допо
антагонист-
N-аллильно
образуется
нистом. На
на, согласо
сельная. В
ной пары ат
к плоскости
правление и
ние места на
молекул опи
исходит в

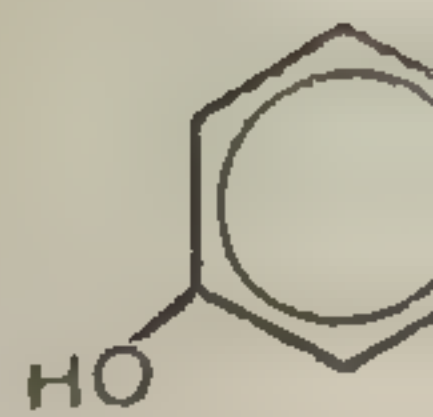
личия, составляющие 5,7 ккал/моль, между лучшей аксиальной и экваториальной конформациями предполагают меньшую теоретическую возможность последней реально взаимодействовать с рецептором. S. H. Snyder и соавт. считают экваториально-кресельную конформацию налоксона наиболее стабильной. Однако удалось показать, что N-аллильная группа налоксона стерически влияет на конформацию молекулы, причем этот эффект как раз наиболее значителен при экваториально-кресельной организации. Напротив, если пиперидиновое кольцо молекулы налоксона обладает гибкостью и принимает форму «косой лодки», а N-аллильная группа при этом находится в псевдоэкваториальном положении, то ее стерический эффект практически не выражен. Это позволяет говорить о последней конфигурации молекулы налоксона, как наиболее термодинамически выгодной и, следовательно, наиболее стабильной.

Резонно полагать, что наиболее стабильная молекулярная форма налоксона, обусловленная конформацией пиперидинового кольца в виде «косой лодки» и N-аллильным радикалом в псевдоэкваториальном положении, взаимодействует в реальных условиях с опиатным рецептором. Оценивая подобное молекулярное взаимодействие лиганда с рецептором, удается показать, что в этом случае вектор неподеленной пары электронов атома азота подвижен и направлен влево через линию, проходящую параллельно 3-ОН и 6-кетогруппе. V. M. Kolb предположила, что аминосвязывающее место антагонистов на рецепторе расположено именно в этом направлении. Стерический эффект N-аллильной группы, направленный на неподеленную пару электронов атома азота, дополнительно стабилизирует ее в направлении антагонист-аминосвязывающего места. При замене N-аллильной группы налоксона на N-метильную группу образуется оксиморфин, являющийся, как известно, агонистом. Наиболее стабильная конформация оксиморфина, согласно выполненным расчетам, экваториально-кресельная. В этих условиях электронное облако неподеленной пары атома азота направлено вправо, под углом 45° к плоскости фенильного кольца. По-видимому, это направление и указывает на топографическое расположение места на рецепторе. Усиление агонистических свойств молекул опиатов при введении F-кольца возможно происходит в результате его сильного взаимодействия с

аминосвязывающим местом агонистов, а также некоторого изменения топографии молекулы наркотика по отношению к рецептору с перемещением вектора неподеленной пары электронов атома азота дистальнее антагонист-аминосвязывающего места. Таким образом, в соответствии с предлагаемой моделью на опиатном рецепторе имеется липофильный участок связывания и два специфически фиксированных аминсвязывающих места (агонистическое и антагонистическое). С последними соответствующие молекулы опиатов реагируют посредством неподеленной пары электронов атома азота. В отличие от модели S. H. Snyder основное действие антагониста при связывании с рецептором осуществляется через ассоциацию неподеленной пары электронов атома азота с аминсвязывающим местом антагониста, а не за счет связывания N-аллильной группы со специфическим антагонистсвязывающим местом. Основная роль N-аллил- или циклопропилметил-цепи заключается в направлении электронного облака неподеленной пары электронов к соответствующему аминсвязывающему месту. Различное действие катионов Na^+ на аффинитет агонистов и антагонистов к рецептору может заключаться не в изменении конформации рецептора, а в неодинаковом влиянии ионов на то или другое аминсвязывающее место.

Не обсуждая вопрос, какая из предложенных моделей — V. M. Kolb или S. H. Snyder — более соответствует реальности, мы считаем уместным подчеркнуть, что как первая, так и вторая, по-видимому, затрагивают лишь некоторые характерные популяции опиатных рецепторов, существующих в организме. В пользу подобного заключения говорят многие данные, рассматриваемые нами в разделе, посвященном гетерогенности опиатных рецепторов. В отношении молекул опиатов имеются сведения о многочисленных стереохимических аномалиях в фармакологическом действии этих наркотиков, не укладывающихся в известные модели опиатных рецепторов [Galt R. H. B., 1977].

Возникает вопрос, согласуются ли эти факты и в какой мере с рассмотренными выше предположениями о возможной молекулярной организации опиатного рецептора? Рассмотрим несколько характерных примеров. Так оба оптических изомера молекулы, представленной на рис. 9 под индексом I с фиксированной экваториаль-



n-F



Рис. 9. Примеры химически активны

но фенильные
Еще более
оптические
стереохимич
следнему в
рой предста
ких дозах с
морфина. П
ственной д
сильный аг
ностью у об
сам являяс
ным вызыва
тические из
3-го во 2-е
них, стерео
дает сходно
имеет слаби

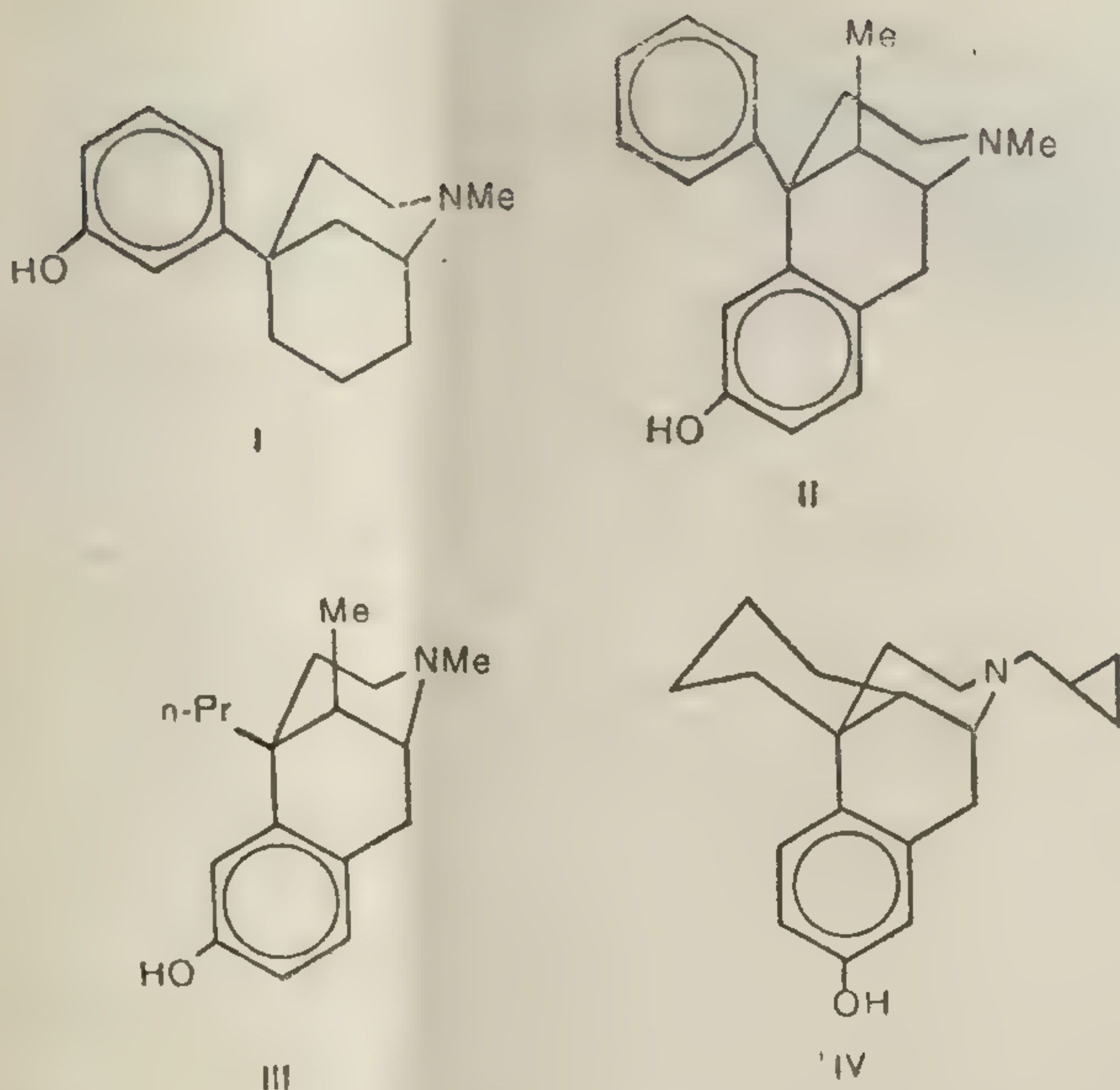


Рис. 9. Примеры стереохимических аномалий (I—IV) фармакологически активных молекул опиатов.

но фенильной группой, обладают опиатной активностью. Еще более необычно, что опиоидные свойства имеют оптические изомеры бензморфанов (II). Один из них, стереохимически сходный с морфином, аналогичен последнему в отношении анальгетической активности. Второй представляет собой более слабый агонист, но в низких дозах способен вызвать физическую зависимость от морфина. Похожий на бензморфан изомер (III) с естественной для опиатов структурой проявляет себя как сильный агонист с незначительной наркотической активностью у обезьян. Его же зеркальный изомер, напротив, сам являясь слабым анальгетиком, при введении животным вызывает быстрое пристрастие. Оригинальны и оптические изомеры морфинона (IV) с перенесенной из 3-го во 2-е положение гидроксильной группой. Один из них, стереохимически соответствующий морфину, обладает сходной с ним анальгетической активностью; второй имеет слабые агонистические свойства. Вместе с тем тот

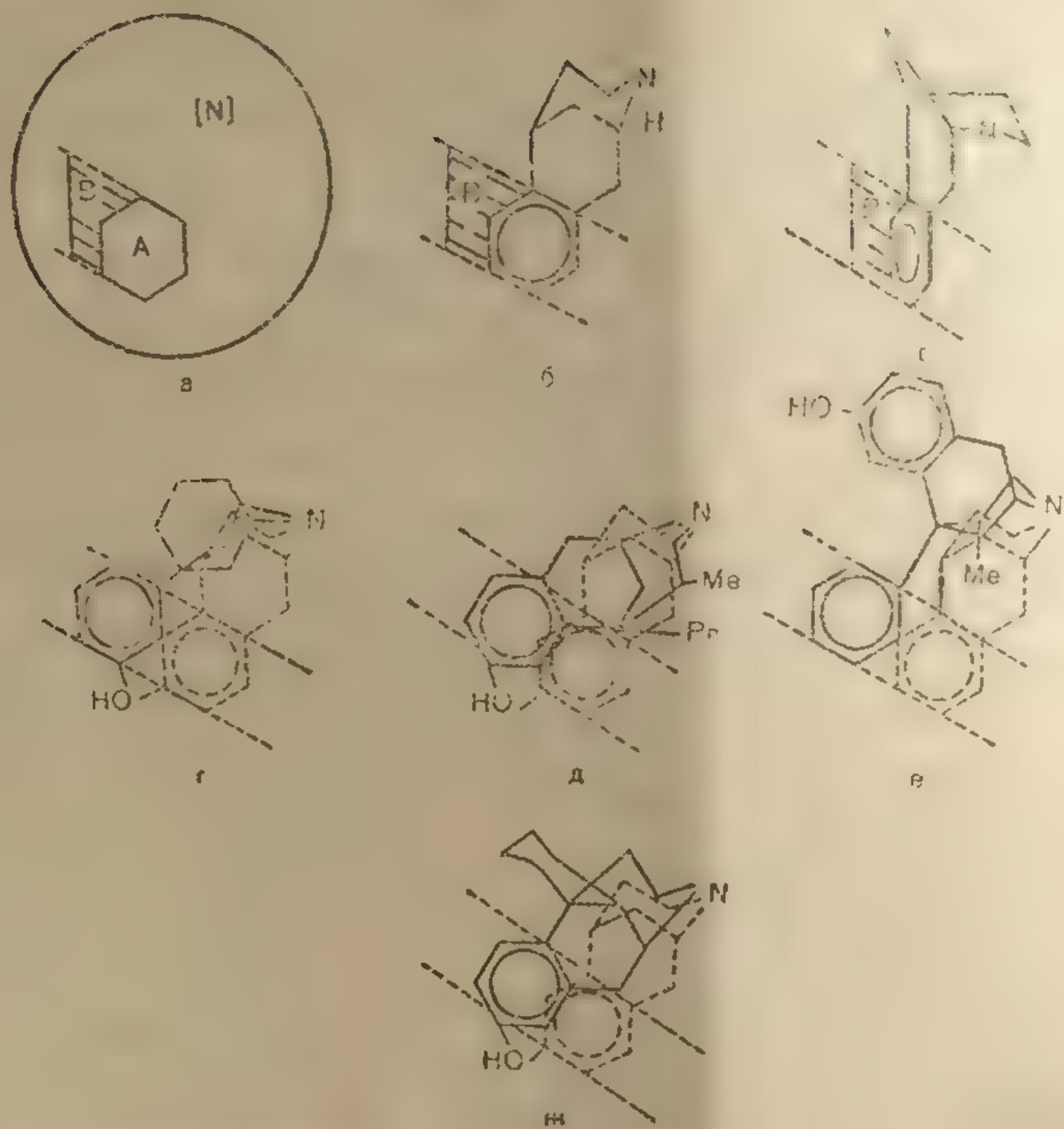


Рис. 10. Модель опиатного рецептора по Н. В. Галт и возможное взаимодействие с ним отдельных (а — ж) молекул опиатов.

и другой имеют одинаковую антагонистическую активность. Пытаясь увязать вышеприведенные факты с рецепторной теорией действия опиатов, Р. Н. В. Галт предлагает схематическую модель рецептора, удовлетворяющую минимальные требования, необходимые для связывания различных молекул с опиатным рецептором (рис. 10, а). В основу этой схемы положена модель А. Beckett и А. F. Casy с небольшой модификацией, заключающейся в некотором расширении плоского участка рецептора в северо-западном направлении и наличии катионного центра. Предлагаемая модель представлена в двух различных проекциях при использовании неподвижной бензоморфановой части молекулы морфина (рис. 10, б, в). Согласно схеме, любые молекулы, которые имеют или могут образовать за счет вращения или конформационных перестроек плоскую поверхность и катионный центр в том же самом пространственном по-

ложении
лять оп
тивный
модель
новый
данного
га, фено
та с ре
вается
кольцо
с позиц
укладыв
азота и
с теми
в то же
сколько

Друг
представ
плоский
(рис. 10,
же укла
его же
каркасу
В цитиру
зательств
схеме оп
нимум тр
активных
тором. В
на, что в
образом
ладающи
стов. В
исходит.
рировании
имеются
деляющи
Р. Н. В.
организме
ные виды
строгим а
рекестий
группе ли
черкнуть

ложении, как на представленной модели, будут проявлять опиоидную активность. В частности, наиболее активный энантиомер I (см. рис. 9) укладывается в эту модель (рис. 10, г) при проекции сверху на бензоморфановый скелет. Видно, что хотя ароматические кольца данного энантиомера и морфина не покрывают друг друга, фенольные группы имеют одинаковую точку контакта с рецептором. Менее активный энантиомер укладывается точно таким же образом, но циклогексановое кольцо в большей степени совмещено с позицией 3, чем с позицией 1. Бензоморфаны также достаточно хорошо укладываются в предлагаемую модель (рис. 10, д). Атом азота и гидроксил в этом случае стерически совпадают с теми же точками бензоморфанового скелета морфина, в то же время плоская поверхность бензоморфана несколько сдвинута в северо-западном направлении.

Другая возможность для связывания с рецептором представлена для энантиомеров II (см. рис. 9), когда плоский участок покрывает не фенольное кольцо (рис. 10, е). Более активный изомер IV (см. рис. 9) также укладывается в расширенный плоский участок, его же зеркальный аналог комплементарен жесткому каркасу естественных опиатных молекул (рис. 10, ж). В цитируемой нами работе приводятся и другие доказательства, свидетельствующие, что на предлагаемой схеме опиатного рецептора действительно дан тот минимум требований, который необходим для связывания активных молекул с опиоидными свойствами с рецептором. Вместе с тем указанная схема настолько условна, что в ряде случаев позволяет доказать тем или иным образом комплексообразование с рецептором молекул, не обладающих свойствами опиатных агонистов и антагонистов. В реальных условиях этого, естественно, не происходит. Кроме минимальных требований, проиллюстрированных Р. Н. В. Galt, на поверхности рецептора имеются различные активные участки, селективно определяющие аффинитет к тому или иному виду молекул. Р. Н. В. Galt совершенно справедливо замечает, что в организме опиатные рецепторы могут принимать различные виды и размеры. В этой связи они могут обладать строгим аффинитетом к определенному лиганду или перекрестным переменным аффинитетом к определенной группе лигандов. Продолжая эту мысль, следует подчеркнуть возможность опиоидной агонистической или

антагонистической активности у соединений, весьма отличных по структуре, включая стерические свойства, от молекул опиатов. Кроме того, сохраняется теоретическая возможность обнаружения фармакологических препаратов и их эндогенных аналогов с большей избирательностью действия в организме. В частности, в настоящее время ведутся интенсивные поиски соединений, обладающих аналгетическими свойствами и в то же время лишенных наркотической активности.

Гетерогенность опиатных рецепторов. Полиморфизм фармакологических эффектов опиатов, проявляющийся как в экспериментах *in vivo*, так и *in vitro*, а также теоретическая невозможность создания универсальной модели опиатного рецептора, удовлетворительно объясняющей действие многочисленных дериватов и аналогов молекул с опиоидными свойствами, логично привели к заключению о существовании в организме нескольких популяций этих рецепторов. Имеющиеся в настоящее время данные убедительно подтверждают это предположение.

Еще в 1967 г. W. R. Martin при изучении фармакологических свойств опиатов эмпирически обосновал возможность наличия в организме нескольких типов опиатных рецепторов, определяющих специфичность действия конкретных молекул. В дальнейшем после биохимического подтверждения взаимодействия опиатов с гетерогенными специфическими рецепторами высказанная гипотеза получила дальнейшее экспериментальное развитие [Gilbert P. E., Martin W. R., 1976; Martin W. R. et al., 1976]. При использовании в качестве объекта исследования хронических спинальных (T — 10) собак с физической зависимостью от морфина и без нее было изучено изменение различных физиологических параметров при введении аналогов морфина и налорфина. Установлено, что фармакологические свойства препаратов в ряде случаев имеют выраженные отличия. Введение спинальным собакам без моделированной физической зависимости морфина и морфиноподобных агонистов (α -проноксифена и бупренорфина) показало, что выраженность эффектов препаратов значительно отличается между собой по силе, но сходна по своим качественным характеристикам. После инъекции этих соединений наблюдаются миоз, брадикардия, гипотермия, аналгезия и индифферентность к внешним раздражителям.

Анали
лорфином
особенно
лил-норфе
циногенны
мом к мо
активност
ного реф
зрачка, уч
ствовал ф
витие дел
фину, сок
тельный р
вотное. О
изменения
кожи, ка
эффекты
лись нало
агонистич
ния физис
мевают ре
эффектов.
паратов п

Дальне
свойств мо
лась в экс
ческой за
препарато
рома у ж
так и, нап
ненции. О
может спо
ма, эквив
блюдаемо
тивность S
локсона. I
морфином,
чает симп

Базиру
стулирова
цепторов
(кетоцикла
мнению, ра
ных препара

Анализ влияния препаратов, имеющих сходство с на-
лорфином, в то же время выявил в их ряду некоторые
особенности фармакологических эффектов. Так, N-ал-
лил-норфеназоцин (SKF-10,047), обладающий галлю-
циногенными свойствами у человека, слабым антагониз-
мом к морфину и нерезко выраженной аналгетической
активностью, вызывал небольшое угнетение сгибатель-
ного рефлекса, дозозависимое увеличение диаметра
зрачка, учащение дыхания, тахикардию, а также способ-
ствовал формированию синдрома, указывающего на раз-
витие делирия у собак. Кетоциклазоцин, подобно мор-
фину, сокращал диаметр зрачка, ингибировал сгиба-
тельный рефлекс и оказывал седативное действие на жи-
вотное. Однако в последнем случае не регистрировалось
изменения частоты пульса или рефлекса подергивания
кожи, как это характерно для морфина. Выявленные
эффекты у всех исследованных препаратов блокирова-
лись налоксоном. Это, с одной стороны, подтверждает
агонистическую направленность обнаруженного измене-
ния физиологических параметров и, с другой подразу-
мекает рецепторно-обусловленный характер найденных
эффектов. Кроме того, хроническое введение этих пре-
паратов приводило к развитию толерантности.

Дальнейшая дифференцировка фармакологических
свойств морфина, SKF-10,047 и кетоциклазоцина выяви-
лась в эксперименте на собаках с моделированной физи-
ческой зависимостью. Была изучена как способность
препаратов провоцировать развитие абстинентного синд-
рома у животных (преципитированную абстиненцию),
так и, напротив, смягчать симптомы развившейся абсти-
ненции. Отмечено, что кетоциклазоцин в дозе 1 мг/кг
может способствовать развитию абстинентного синдро-
ма, эквивалентного по выраженности состоянию, на-
блюдаемому при введении 0,0075 мг/кг налоксона. Ак-
тивность SKF-10,047 в этом отношении составила $\frac{1}{8}$ на-
локсона. Развившаяся абстиненция хорошо снимается
морфином, однако кетоциклазоцин практически не смяг-
чает симптомов абстиненции.

Базируясь на вышеприведенных данных, авторы по-
стулировали возможность существования трех форм ре-
цепторов опиатов, которые назвали μ — (морфин), κ —
(кетоциклазоцин) и σ — (SKF-10,047) рецепторы. По их
мнению, различные фармакологические свойства изучен-
ных препаратов обусловлены специфическим взаимодей-

ствием с различными популяциями опиатных рецепторов. В рамках расшифровки этого положения представляют интерес следующие данные, полученные на собаках без моделированной наркотической зависимости (табл. 2).

Несмотря на то что допускается несколько интерпретаций наблюдаемых эффектов, их можно достаточно логично объяснить и с точки зрения существования трех популяций опиатных рецепторов. В соответствии с этим допущением анальгетические свойства опиатов могут принадлежать всем трем типам выявленных рецепторов. В то же время по выраженности аффинитета препараты можно разделить на несколько групп.

В группу А будут входить соединения, являющиеся чистыми или частичными агонистами морфина. По-видимому, морфин может также взаимодействовать и с κ -рецептором, обеспечивая нерезко выраженный седативный эффект в результате этого связывания и отсутствием подавления абстиненции, вызванной циклазоцином. В группу Б отнесены препараты, стереоспецифичные к κ -рецепторам, а в группу В — конкурентные антагонисты μ -рецепторов или частичные агонисты κ - и σ -рецепторов. В отношении N-аллилморфеназоцина (SKF-10,047), выделенного в отдельную группу Г, можно полагать, что этот препарат представляет собой чистый конкурентный антагонист μ -рецепторов. В то же время он является чистым агонистом σ -рецепторов.

Касаясь механизма действия последнего соединения, следует подчеркнуть отмеченное авторами значительное сходство SKF-10,047 по фармакологическому действию с апоморфином. Это указывает на то, что σ -рецепторы могут вовлекаться в дофаминергические механизмы регуляции проведения нервного импульса. Несомненно, таким образом, что эффект различных опиоидных препаратов будет зависеть, с одной стороны, от дозы введенного вещества, а с другой стороны, от выраженности аффинитета к μ -, κ - и σ -рецепторам.

В последующем был проведен более тщательный анализ отличий в связывающей способности μ - и κ -рецепторов [Kosterlitz H. W., Leslie F. M., 1978]. Авторы изучали ингибцию связывания [3 H]-налоксона различными морфиноподобными и кетазоциноподобными опиатными агонистами в гомогенатах мозга и препарате продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки. Предваритель-

Характеристики

Фармакологические

Частота
Диаметр
Частота
Температура
Сгибатель
Рефлекс
кожи
Подавление
абстиненции
Подавление
вой абстиненции
Поведение
у собак
Выраженность
препаратов
А. Морфин

Бупренорфин

Б. Кетозоцин

WIN —

В. Циклазоцин

Налорфин

Пентазоцин

Оксилорфин

Дипренорфин

Г. SKF-10,047

Примечание:
ложительные
ВА — высокий
аффинитет;
Ва — выраженный
агонист
си-8-кето-9(а)

Таблица 2

Характеристики μ -, κ - и σ -рецепторов опиатов

Фармакологический параметр	Типы рецепторов опиатов		
	μ	κ	σ
Частота пульса	↓	0	↑
Диаметр зрачка	↓	↓	↑
Частота дыхания	↓	0?	↑
Температура тела	↓	0?	↑
Сгибательный рефлекс	↓↓	↓↓	↓
Рефлекс подергивания кожи	↓↓	↓	0
Подавление морфинной абстиненции	+	0	0
Подавление циклозацино- вой абстиненции	+	+	
Поведенческие эффекты у собак	инди- ферентен	седация	делирий
Выраженность аффинитета препаратов			
А. Морфин	ВА Ва	СА Ва	Н или КА Н или Ка
Бупренорфин	ВА На		Н или КА Н или Ка
Б. Кетоциклозоцин	НА На	ВА Ва	Н или КА Н или Ка
WIN — 35,197 — 2*	КА Ка	ВА Ва	Н или Ка Н или Ка
В. Циклазоцин	ВА Ка	ВА Ва	ВА Ва
Налорфин	ВА Ка	ВА На	НА На
Пентазоцин	НА Ка	НА Ва	НА Ва
Оксилорфан	ВА Ка	ВА На	ВА На
Дипренорфин	ВА Ка	ВА На	НА Са
Г. SKF-10,047	ВА Ка		ВА Ва

Примечание: ↓ — уменьшение; ↑ — увеличение; (+ и —) — положительный или отрицательный эффект; 0 — отсутствие эффекта; ВА — высокий аффинитет; СА — средний аффинитет; НА — низкий аффинитет; КА — конкурент с более выраженным аффинитетом; Ва — выраженный агонист; Са — агонист средней силы; На — слабый агонист. * — [(+) — 3-(циклопропилметил-5-(эрг)-этил-2-гидрокси-8-кето-9(акс)-метил-6,7-бензоморфанметан сульфонат].

тельными экспериментами было показано, что обе тестируемые биологические системы, содержащие рецепторы для опиатов, являются идентичными и имеют в своем составе как μ -, так и κ -рецепторы. Обнаружено, что хотя использованные препараты не обладали антагонистическими свойствами, натриевый индекс (отношение 50% действенной концентрации препарата в присутствии и отсутствии Na^+) отличался весьма значительно у морфиноподобных и кетазоциноподобных агонистов. В то время как для морфина он составлял 65 и 49 соответственно при работе с гомогенатом мозга и препаратами подвздошной кишки, в случае этилкетозоцина отношения были равны 6,9 и 6,7. На основании этих наблюдений сделано заключение, что κ -рецепторы менее чувствительны к Na^+ , чем μ -рецепторы.

Можно предположить, что некоторые препараты, обладающие смешанными агонист-антагонистическими свойствами, могут взаимодействовать как с μ -, так и с κ -рецепторами, обеспечивая специфичность их действия. Не исключено, что различия, наблюдаемые в эффектах опиатов при работе на препаратах подвздошной кишки морских свинок и *vas deferens* мышей, во многом объясняются преимущественным содержанием в последних κ -рецепторов.

Имеются сведения, что эффекты опиатов могут осуществляться и в результате специфического взаимодействия с другими рецепторами, не идентичными (или в настоящее время не идентифицируемыми) с μ -, κ - и σ -популяциями. В частности, Y. F. Jacquet с соавт. (1977) обнаружили весьма интересные фармакологические свойства естественного (—) морфина и его искусственного стереоизомера (+) морфина. В опытах *in vitro*前者, в несколько тысяч раз слабее по сравнению с естественным аналогом по способности вытеснять [^3H]-дипропоморфин из специфических мест связывания, а также по ингибированию электростимулированного сокращения препарата подвздошной кишки морской свинки и снижению активности аденилатциклазы.

В исследованиях *in vivo* обнаружено, что микроинъекции (—)морфина в серое вещество периаквадукта крыс вызывают ярко выраженную аналгезию, а также специфический синдром гиперреактивности, характеризующийся определенным двигательным поведением (под-

прыгивание животных вертикально до 60 см в ответ на слуховые и зрительные раздражители). Отмечено, что подобное поведение специфично для морфина и героина и не наблюдается после микроинъекций других опиатов, таких, как леворфанол, декстрорфан, метадон и эторфин. Длительность течения аналгезии и гиперреактивности существенно различаются. Сделано предположение, что подобные различия могут быть обусловлены медиацией этих эффектов через две самостоятельные системы рецепторов.

Введение искусственного энантиомера морфина в билатеральную зону серого вещества периакведукта крыс (5 мкг в 0,5 мкл) не сопровождалось выраженным изменением аналгетической реакции и поведения животных. Повышение дозы вводимого препарата (до 40 мкг в 0,5 мкл) способствовало развитию на фоне слабовыраженной аналгезии стереоспецифических прыжков в ответ на внешнее раздражение. Налоксон, вводимый интраперитонеально, не блокировал указанные эффекты (+)морфина. По мнению авторов, полученные результаты позволяют предположить, что существуют по крайней мере два класса опиатных рецепторов в клетках серого вещества периакведукта крыс. Один из них является высокоспецифическим, и связывание с ним лигандов блокируется налоксоном. Другие рецепторы менее специфичны; эффекты, проявляющиеся при взаимодействии с ними, не блокируются налоксоном. В то же время именно последние определяют развитие гиперреактивности.

Следует иметь в виду, что подобная форма рецепции свойственна не только нейронам серого вещества периакведукта. В частности, наблюдения указывают на их наличие и в ретикулярной формации среднего мозга. Микроинъекции (—) и (+) морфина в дозе 20 мкг в эту область мозга сопровождались взрывными вспышками ипсилатерального вращения крыс, которые не блокировались налоксоном. Эти вращения, как было найдено, весьма специфичны для морфина и не наблюдаются после микроинъекций других опиатов и нейротропных средств. Полагают, что эффекты энантиомеров морфина в ретикулярной формации среднего мозга могут осуществляться за счет взаимодействия с низкоспецифическими рецепторами, подобными обнаруженным в периакведукте крыс. Интересно, что стереоспецифические

прыжки и ипсилатеральное вращение никогда не наблюдаются при хроническом введении морфина крысам. В то же время эта симптоматика весьма характерна при длительном введении налоксона.

Считалось твердо установленным, что подобная особенность поведения определяет развитие опиатной зависимости и имеет место только при преципитированной абстиненции. Исходя из вышеизложенного, можно полагать, что подобный взгляд нуждается в дополнительном анализе. Действительно, в приведенных выше исследованиях стереотипические прыжки и вращение регистрировались у животных, не имеющих физической зависимости от наркотиков уже после однократной микроинъекции морфина в серое вещество периаквадукта крысы или ретикулярной формации среднего мозга. Заслуживают внимания выводы авторов, сделанные на основании результатов этих наблюдений. Они полагают, что при микроинъекциях морфина его эффект осуществляется только за счет локального взаимодействия с рецепторными системами ограниченных участков мозга. При обычном же введении морфина его действие распространяется и на другие отделы мозга, имеющие опиатные рецепторы. Эти дополнительно вовлеченные в фармакологический механизм нейрональные системы могут, по-видимому, обеспечивать ингибирующий эффект на зоны периаквадукта или ретикулярной формации среднего мозга. Косвенно этот вывод подтверждается известными наблюдениями о том, что связывание морфина с рецепторами хвостатого ядра, являющегося частью экстрапирамидной системы, сопровождается развитием ригидности и неподвижности тела, т. е. имеются симптомы, противоположные тем, которые возникают при действии морфина на серое вещество периаквадукта и ретикулярную формацию. Весьма возможно, что одновременное влияние на эти две системы ведет к нивелированию возбуждающего эффекта морфина.

Более того после введения налоксона животным с физической зависимостью от морфина происходит избирательная блокада только рецепторов, чувствительных к этому антагонисту. В результате этого снимается ингибирующий эффект, и на первый план выступают фармакологические ответы, характерные для ретикулярной формации среднего мозга и серого вещества периаквадукта.

Да
по кр
влени
муля
прояв
ных
блюдо
ской,
они
ления
генно
В
лични
in vi
гипот
ково
В пер
препа
щего
в ин
связи
ляло
Нась
тала
сутст
инку
ло 5
ции
шали
вает
на э
рова
зыва
сыщ
умен
афф
А
бога
выяв
ное
общ
в ср
чите
разо

Данное заключение предполагает вывод о том, что не крайней мере у крыс важным механизмом в осуществлении эффектов морфина может быть селективная стимуляция не чувствительных к налоксону рецепторов, проявляющаяся только вследствие блокады чувствительных к налоксону рецепторных молекул. Указанные наблюдения представляют интерес не только с теоретической, но и с практической точки зрения. Действительно, они дают основание предполагать возможность разделения анальгетических эффектов опиатов от их наркотической активности.

В ЦНС имеются также опиатные рецепторы с различным аффинитетом к антагонистам. В экспериментах *in vitro* обнаружены рецепторные популяции в таламо-гипоталамической области мозга и мозжечке, не одинаково связывающие [3 H]-налоксон [Akera T. et al., 1975]. В первом случае насыщаемое специфическое связывание препарата колебалось в пределах от 62 до 64% от общего связывания [3 H]-налоксона при его концентрации в инкубационной среде от 1 до 25 нМ. Максимальное связывание, рассчитанное по кривым Скетчарда, составляло $0,383 \pm 0,025$ пМ/мг белка с $K_{дисс} 8,95 \pm 0,81$ нМ. Насыщаемое связывание [3 H]-налоксона с рецепторами таламо-гипоталамической области повышалось в присутствии 50 мМ NaCl. При концентрации налоксона в инкубационной среде 5 и 10 нМ это повышение составило 54 и 33% соответственно. Более высокие концентрации NaCl (100 или 150 мМ) в меньшей степени повышали насыщаемое связывание антагониста. Это указывает на двухфазный характер действия катионов NaCl на эти рецепторы. Скетчардовский анализ продемонстрировал, что 50 и 100 мМ Na^+ повышают аффинитет связывающих мест рецепторов к налоксону. Напротив, насыщаемое связывание налоксона в значительной степени уменьшалось в присутствии 50 мМ KCl, который снижал аффинитет опиатного рецептора к антагонисту.

Аналогичные эксперименты, проведенные *in vitro* с богатой опиатными рецепторами фракцией мозжечка, выявили другие закономерности. Насыщаемое рецепторное связывание в этом случае составляло 13 и 10% от общего связывания при концентрации [3 H]-налоксона в среде от 2 до 25 нМ. Ионы Na^+ также, как и K^+ , значительно снижали насыщаемое связывание. Таким образом, приведенные данные указывают, что в организме

существуют по меньшей мере два типа рецепторов для антагонистов, причем их распределение весьма отличается в различных областях мозга.

В последующем эти исследования получили дополнительное экспериментальное подтверждение в исследованиях R. F. Squires и C. Braester (1978). Установлено, что в целом гомогенате диэнцефалона крыс некоторые агонисты и антагонисты опиатов (эторфин, дипренорфин и циклазоцин) вытесняют только 75% [^3H]-налоксона, специфически связанного с опиатными рецепторами. Другие же агонисты и антагонисты, такие, как морфин, налорфин, налоксон, никоморфин, кетобемидон и фентанил, полностью освобождают меченый налоксон из специфических мест связывания. Эти наблюдения, по мнению авторов, указывают на то, что существуют два типа рецепторов, имеющих не одинаковый аффинитет к налоксону. Один вид специфического связывания исследователи назвали ассоциацией I типа; она характеризуется высоким сродством к эторфину, дипренорфину и циклазоцину. Другой вид рецепторного связывания (II тип) более специфичен для таких агонистов и антагонистов опиатов, как морфин и налоксон.

Обнаружены различия в физико-химических и биологических свойствах этих двух типов опиатных рецепторов. Так, они значительно отличаются по термостабильности. Специфическое связывание [^3H]-налоксона с рецептором I типа нарушается при $+50^\circ\text{C}$ в течение 20 мин. Рецепторы II типа более термостабильны и выдерживают нагревание при этой температуре в течение 40 мин. Анализ взаимодействия [^3H]-налоксона с рецептором в интервале от 0 до $+37^\circ\text{C}$ позволил установить, что связывание I типа относительно не чувствительно к температурным колебаниям в этих пределах и максимально при $10-25^\circ\text{C}$. Взаимодействие [^3H]-налоксона с рецепторами II типа максимально при 0°C и быстро снижается с повышением температуры, не регистрируется уже при $+20^\circ\text{C}$. Оптимальные условия для связывания антагониста с рецепторами I и II типов находятся при pH 8,0. В то же время при pH 6,0 и 9,0 наблюдается взаимодействие [^3H]-налоксона с рецепторами только I типа. Кинетический анализ Скетчарда продемонстрировал, что $K_{\text{дисс.}}$ составляет 2 и 16 нМ с максимальными связывающими концентрациями порядка 3 и 12 пм/г $^{-1}$ массы ткани мозга для рецепторов I и II типа соответ-

ственно.
зывание
в случае
повышен
локсон,
ствию N
ние, как
тагонист

Анали
цепторов
специфи
лишь 15
основном
в затыло
париетал
количест
поталаму
гают, чт
позиций
рецептор
опиатног
стическо

Еще
рецептор
действия
аналгези
гонистич
гаемой
опиатны
два типа
линергич
При вза
дит инги
сировани
нетением

Рецеп
ток пече
характер
В частно
левалло
с рецепто
но, оказ
[^3H]-диг
ческих м

ственно. Выявлены различия и во влиянии Na^+ на связывание опиатов с этими рецепторами. В то время как в случае рецепторов I типа наблюдалось значительное повышение способности рецептора связывать $[\text{}^3\text{H}]$ -налоксон, рецепторы II типа были не чувствительны к действию Na^+ . Более того найдено даже некоторое снижение, как и в предыдущем исследовании, связывания антагониста с опиатным рецептором.

Анализ регионарного распределения опиатных рецепторов показал, что I тип обеспечивает около 90% специфического связывания в продолговатом мозге и лишь 15% в мозжечке. Напротив, рецепторы II типа в основном определяются в мозжечке и в меньшей степени в затылочной и фронтальной коре мозга, гиппокампе и париетальной коре, а также в относительно небольших количествах в лимбической системе, полосатом теле, гипоталамусе и мосте продолговатого мозга. Авторы полагают, что полученные ими данные заставляют с новых позиций оценить ранее предложенные модели опиатного рецептора, в которых постулировалось наличие единого опиатного рецептора в двух взаимопереходных (агонистической и антагонистической) конформациях.

Еще два функционально различных типа опиатного рецептора были обнаружены при изучении механизма действия N-замещенных азидоморфинов, обладающих анальгезирующим эффектом и смешанной агонист-антагонистической активностью [Knoll A., 1978]. По предлагаемой терминологии на основании этих исследований опиатные рецепторы в целом можно подразделить на два типа (A и B), которые связаны соответственно с холинергической и катехоламинергической иннервацией. При взаимодействии опиатов с A-рецепторами происходит ингибция высвобождения ацетилхолина. Комплексообразование опиатов с B-рецепторами сопровождается угнетением высвобождения дофамина или норадреналина.

Рецепторное связывание опиатов с мембранами клеток печени и почек морских свинок также имеет свои характерные особенности [Simantov R. et al., 1978]. В частности, обнаружена реверсия стереоспецифичности леваллорфана и декстраллорфана при взаимодействии с рецепторами почек. Последний препарат, как ни странно, оказался более активным в отношении вытеснения $[\text{}^3\text{H}]$ -дигидроморфина и $[\text{}^3\text{H}]$ -налоксона из специфических мест связывания. Кроме того, мет-энкефалин, его

D-Ала²-аналог и-β-эндорфин не влияли на связывание [³H]-налоксона даже в очень высокой концентрации (порядка 1 мкМ). Напомним, что 50% ингибция связывания [³H]-налоксона с рецепторами мозга этими соединениями происходит при их концентрации 8—15 нМ. Авторы отмечают, что выявленный эффект не связан с более быстрым метаболизмом энкефалинов и β-эндорфина в ткани почек. Рецепторы мембран клеток почек морских свинок обладают более выраженным аффинитетом, к агонистам, чем антагонистам. Так, сродство морфина к специфическим местам связывания в 20 раз более выражено, чем у налорфина и леворфаноло, в 15 раз превосходит леволлорфан и оксиморфон и в 3 раза налоксон. Некоторые опиаты, такие, как эторфин и дипренорфин, вообще не связываются специфически с этими рецепторами. Катионы Na⁺ не влияют на связывание агонистов и антагонистов с рецепторами почек и печени. Напротив, Mn²⁺, который, как известно, не изменяет в тканях мозга связывания налоксона с рецептором и повышает связывание дигидроморфина, морфина и мет-энкефалина, в случае мембранных рецепторов печени и почек снижает связывание агонистов и антагонистов опиатов.

Можно полагать, что обнаруженные рецепторы, во многом отличающиеся от рецепторов ЦНС, имеют специфические функции, не связанные с традиционно изученными эффектами опиатов. Логично допустить, что их физиологическое значение заключается в обеспечении транспортных процессов, однако необходимы дополнительные исследования в этом направлении.

Высокая гетерогенность, а вместе с тем и специфичность опиатных рецепторов ярко проявились и при изучении связывания эндогенных лигандов. Получены прямые экспериментальные доказательства существования двух связывающих мест с различным аффинитетом к опиным алкалоидам и опиоидным пептидам [Gillan M. G. S. et al., 1979; Kosterlitz H. W. et al., 1979]. На гомогенатах целого мозга морских свинок без мозжечка были исследованы кинетические параметры связывания различных экзогенных и эндогенных лигандов с опиатными рецепторами. Обнаружено, что K_{дисс.} для связывания D-Ала²-D-Лей⁵-энкефалина составляет 1,27 ± ±0,16 нМ и число специфических связывающих мест 7,4 ± 0,31 пм/г массы сырой ткани; K_{дисс.} D-Ала²-лейцин-

энкефалина
равны 2,5
мест соот
±2,22 пм
мест было
однако эт
рецептора
с D-Ала²-
морфина
и общее
тор соста
мозга соот
двух лига
морфина
разцов в
для кажд
ние, что
связываю
финоподо
энкефали
гандов пе
ми этих
число свя
эторфина

Приве
ния еще
цептора
ют, что
тендный
(рис. 11)
ческого
вой част
ном обе
ствие с
ный же
за ассоц
калоидам
которые
β-эндорф
ствовать
При это
розни к
тому це
связыва

энкефалинамида и D-Ала²-метионин-энкефалинамида равны $2,52 \pm 0,48$ и $1,96 \pm 0,17$ нМ, а число связывающих мест соответственно составляет $12,4 \pm 0,93$ и $12,8 \pm 2,22$ пм/г органа. Сходное количество связывающих мест было обнаружено для эторфана ($15,4 \pm 2,4$ пм/г), однако этот лиганд имел более высокий аффинитет к рецепторам мозга ($0,37 \pm 0,03$ нМ) по сравнению с D-Ала²-энкефалинамидом. Для морфина и дигидроморфина найдено два типа специфического связывания и общее число мест посадки этих препаратов на рецептор составляло $3,7 \pm 0,59$ и $4,3 \pm 0,36$ пм/г сырой массы мозга соответственно. При оценке связывания смеси двух лигандов — D-Ала²-D-Лей⁵-энкефалина и дигидроморфина установлено, что уровень радиоактивности образцов в этом случае превосходит таковой, определенный для каждого лиганда в отдельности. Сделано заключение, что в мозге морских свинок существует два типа связывающих мест: одно — более специфичное для морфиноподобных лигандов (μ -рецепторы), другое — для энкефалиноподобных лигандов (δ -рецепторы). Ряд лигандов перекрестно реагирует со связывающими местами этих рецепторов. Именно этим объясняется большое число связывающих мест у D-Ала²-энкефалинамидов и эторфина.

Приведенные данные послужили основой для создания еще одной модели функционирующего опиатного рецептора [Lee N. M., Smith A. P., 1980]. Авторы полагают, что данный рецептор представляет собой липопротеидный комплекс, имеющий два связывающих центра (рис. 11). Участок специфического связывания на белковой части рецептора в основном обеспечивает взаимодействие с энкефалинами. Липидный же компонент ответствен за ассоциацию с опиными алкалоидами. В то же время некоторые лиганды, такие, как β -эндорфин, могут взаимодействовать с обоими центрами. При этом N-терминальный тирозин комплементарен белковому центру специфического связывания; область, рас-

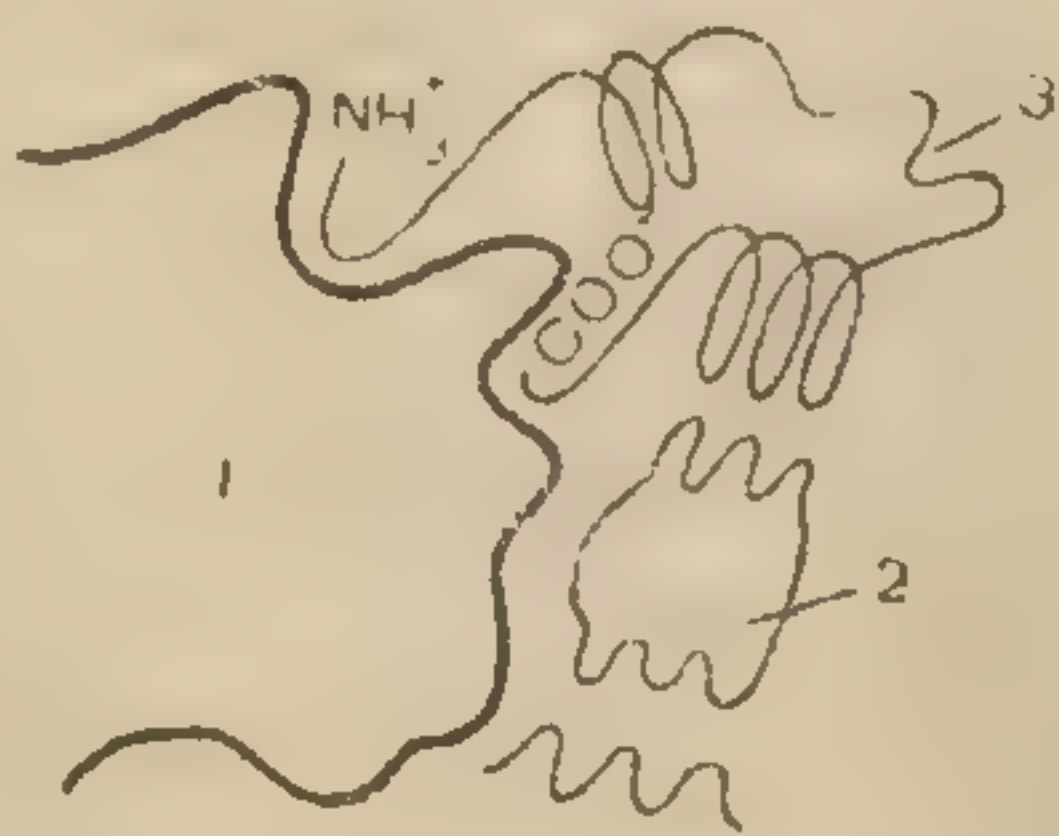


Рис. 11. Модель опиатного рецептора по N. M. Lee и A. P. Smith.

1 — протеиновая часть рецептора; 2 — кислый липид; 3 — β -эндорфин.

положенная около С-терминального конца, в силу конформационных особенностей способна реагировать с липидным центром.

Прямое экспериментальное доказательство присутствия в мозге специфичных к энкефалинам рецепторов было получено в опытах с феноксibenзамином, необратимо ингибирующим как связывание [^3H]-дигидроморфина с рецепторами μ -типа, так и комплексообразование [^3H -D-Ала²-D-Лей⁵]-энкефалина с рецепторами δ -типа. Подобное ингибирование имеет дозозависимый характер, и феноксibenзамин в пределах доз от 0,2 до 10 мкМ блокирует связывание лигандов на 20 и 100% соответственно. Необратимая инактивация довольно легко предотвращается при внесении в систему высокоспецифического немеченого лиганда перед добавлением феноксibenзамина. Эта особенность и была использована при определении связывания [^3H]-дигидроморфина в присутствии немеченого аналога. Последний в 6 раз был более активен как протектор связывающих мест, чем [D-Ала²-D-Лей⁵]-энкефалин. Напротив, для протекции связывающих мест от необратимой ингибиции феноксibenзамином при анализе взаимодействия [D-Ала²-D-Лей⁵]-энкефалина требовалось в 20 раз больше дигидроморфина, чем [D-Ала²-D-Лей⁵]-энкефалина. Действие феноксibenзамина полностью предотвращалось как в отношении μ -, так и δ -рецепторов, когда в систему вносили [D-Ала²]-энкефалинамид. Это подтверждает способность указанного лиганда взаимодействовать со связывающими местами μ - и δ -типа.

В организме, однако, существуют и такие рецепторы, которые специфичны только для эндогенных лигандов и не взаимодействуют с традиционно используемыми опиатами. В частности, подобные рецепторы с высоким аффинитетом к β -эндорфину были обнаружены на плазматической мембране клеток в культуре трансформированных человеческих лимфоцитов (RMP1 6237): содержащих рецепторы инсулина. Связывание человеческого [^{125}I][D-Ала²]-эндорфина с рецепторами этих клеток носит двухфазный характер, в котором высокоспецифическое взаимодействие достигает плато в районе 7 нМ; $K_{\text{дисс.}}$ данного связывания составляет 3×10^{-9} М. Характерно, что агонисты и антагонисты опиатов не конкурируют за высокоспецифическое связывание β -эндорфина даже при добавлении в концентрации 10^{-5} М. Естест-

венни
биру
этот
нов,
да. Т
цитст
не об
Можн
лекул
так к
тором
при о
резист
Су
на ме
зывает
ральн
отлич
но, что
ется в
мическ
Та
сведен
ляет д
сти эт
органи
аффин
 β -эндо
вого к
водным
физиол
нов и

венные мет- и лей-энкефалины, но не их дериваты ингибируют связывание β -эндорфина на 20—30%, однако этот эффект проявляется при концентрации энкефалинов, в 1000 раз превышающую таковую меченого лиганда. Такие гормоны, как β -липотропин, АКТГ, α -меланокитстимулирующий гормон, инсулин и глюкагон, также не обладают аффинитетом к рецептору β -эндорфина. Можно думать, что за специфическое связывание в молекуле β -эндорфина отвечает COOH -концевой участок, так как α -эндорфин не взаимодействует с этим рецептором. Высокоспецифическое связывание нарушается при обработке клеток трипсином, но данные рецепторы резистентны к действию фосфолипазы А.

Существование подобных специфических рецепторов на мембранах циркулирующих в крови лимфоцитов указывает на возможность регуляции эндорфинами центральных и периферических физиологических процессов, отличных от известных в настоящее время. Не исключено, что одной из подобных регуляторных функций является включение β -эндорфина в сложную систему биохимических процессов, сопутствующих стрессу.

Таким образом, приведенный нами краткий анализ сведений о гетерогенности опиатных рецепторов заставляет думать о более широкой и многогранной деятельности этих рецепторных молекул в условиях целостного организма. Наличие рецепторов, обладающих высоким аффинитетом к эндогенным лигандам, в частности к β -эндорфину, при практически полном отсутствии такового к опиным алкалоидам и их синтетическим производным и аналогам требует более обширного изучения физиологических и фармакологических свойств эндорфинов и энкефалинов.

Глава 2

ЭНДОГЕННЫЕ ЛИГАНДЫ С ОПИОИДНЫМИ СВОЙСТВАМИ. ИХ СТРУКТУРА И ФУНКЦИЯ

Открытие опиатных рецепторов поставило перед учеными новые фундаментальные общепрофизиологические проблемы. Наряду с тем что существенно расширялись наши представления о молекулярных механизмах действия опиатных агонистов и антагонистов, в течение некоторого времени оставался открытым вопрос о физиологическом значении опиатных рецепторов в ЦНС, особенно интактного организма. С большей или меньшей вероятностью априори можно было предположить по крайней мере две возможности, объясняющие их существование. С одной стороны, в процессе длительной эволюции в организм могли попадать соединения с опиоидными свойствами (алкалоиды растений) и опиатные рецепторы сформировались как результирующий эффект этих длительных воздействий в качестве приспособительного механизма. С другой стороны, молекулы опиатов растительного происхождения и их синтетические аналоги могут лишь имитировать действие предшествующих эндогенных лигандов опиатного рецептора, имеющего самостоятельное значение для функционирования ЦНС.

В пользу второго предположения свидетельствуют данные о наличии эндогенных соединений, способных вызывать анальгезирующий эффект и имитировать действие опиатов. Так, в 1960 г. W. J. Muggou и J. W. Miller выявили опиоидную активность экстрактов задней доли гипофиза. Анальгетическими свойствами обладала и субстанция Р (ундекапептид), причем ее действие локализовалось на уровне синапсом. (Это позволило В. Регану в 1953 г. отнести указанный пептид к центральным нейромедиаторам.) Возможность существования эндогенных гуморальных анальгетиков также была обоснована исследованиями Н. О. J. Collier (1973) и А. Goldstein (1975). Экспериментальное подтверждение роли

опиатных рецепторов
ответственных
лигандов с
в оригиналь
hes [Hughes

В экстрактах
лены лиганды
морфину, и
сокращение
мышцы под
блокировал
ганды оказ
метионин-
лины).

В том же
подобной а
быка и сви
et al., 1975
проявляют
связывание
га морских
мой мышце
тидный пре
ры в то в
peptid) им
ство с изв
лизингинги
чался от э
описанных

В после
финоподоб
ние, и за
формации
добный ин
ролью эн
расширив
ЦНС в ф
полученны
реть пато
числе нар
предпосыл
ванной те
ние эндо
ностью, и

опиатных рецепторов как биохимических структур, ответственных за специфическое связывание эндогенных лигандов с расшифрованной структурой, было получено в оригинальных, ставших классическими опытах J. Hughes [Hughes J. et al., 1975].

В экстрактах мозговой ткани были найдены и выделены лиганды опиатного рецептора, которые, подобно морфину, ингибировали электрически стимулированное сокращение *vas deferens* мышей и препарата продольной мышцы подвздошной кишки морских свинок. Эффект блокировался налоксоном. Выявленные эндогенные лиганды оказались пептапептидами и получили название метионин- и лейцин-энкефалинов (мет- и лей-энкефалины).

В том же году были выделены пептиды с морфиноподобной активностью из грубого экстракта гипофиза быка и свиньи [Cox B. M. et al., 1975; Teschemacher H. et al., 1975]. Установлено, что найденные соединения проявляют свойства опиатных агонистов и ингибируют связывание опиатов с синаптическими мембранами мозга морских свинок, а также сокращение препарата прямой мышцы подвздошной кишки этих животных. Пептидный препарат с опиатоподобными свойствами (авторы в то время называли его ПОП-1 — Pituitary opioid peptide) имел по химическим свойствам некоторое сходство с известными гипоталамическими релизинг- и релизингингибирующими факторами и значительно отличался от эндогенных лигандов, выделенных из мозга и описанных J. Hughes.

В последующем изучение эндогенных пептидов с морфиноподобной активностью привлекло всеобщее внимание, и за короткое время накоплен большой объем информации об этих соединениях. С одной стороны, подобный интерес вызван выявленной физиологической ролью эндогенных пептидов, в значительной степени расширивших наши представления о функционировании ЦНС в физиологических условиях. С другой стороны, полученные данные позволили с новых позиций рассмотреть патогенез ряда психических заболеваний, в том числе наркоманий и алкоголизма, создавая реальные предпосылки для разработки патогенетически обоснованной терапии указанных нарушений. Успешное изучение эндогенных пептидов с морфиноподобной активностью, или, как их еще называют, пептидов-аналгети-

ков, объясняется во многом и хорошо разработанной экспериментальной техникой исследования опиатных рецепторов — возможностью изменения связывания при вариации ионного состава среды и особенно наличием антагонистов морфина в качестве основных элементов, позволяющих с высокой точностью определять фармакологические эффекты опиоидных пептидов и контролировать их выделение в синтез. Ниже будут рассмотрены основные данные по этому вопросу.

КЛАССИФИКАЦИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНДОГЕННЫХ ЛИГАНДОВ С МОРФИНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Период изучения эндогенных морфиноподобных соединений насчитывает немногим более 5 лет. Согласно J. Hughes (1978), в настоящее время эти соединения классифицируются следующим образом.

- I. Эндорфины
 - β-эндорфин (ЛТГ 61—91)
 - α-эндорфин (ЛТГ 61—76)
 - γ-эндорфин (ЛТГ 61—77)
- II. Энкефалины
 - мет-энкефалин (тир-гли-гли-фен-мет)
 - лей-энкефалин (тир-гли-гли-фен-лей)
- III. Неидентифицированные пептиды
 - ξ-эндорфин мозга (мол. м. ~ 1200)
 - Пептиды полосатого тела (мол. м. ~ 2000 и 1200)
 - Пептиды мозга (мол. м. ~ 2000—3000, устойчивые к трипсину, но не к цианогенбромиду)
 - Пептиды цереброспинальной жидкости (мол. м. < 1500, химических характеристик нет, но отличаются от ЛТГ-фрагментов и энкефалинов)

Эту классификацию можно дополнить. В частности, С. В. Pert и соавт. (1976) обнаружили пептид с морфиноподобными свойствами в крови животных, который был назван анодинином. Необходимо отметить также наличие в мозге в физиологических условиях непептидных соединений с опиоидной активностью, известных в литературе как морфиноподобный компонент [Gintzler A. R. et al., 1976].

Для оценки физиологической роли эндогенных морфиноподобных соединений вначале необходимо рассмотреть их физико-химические свойства и известные структурные особенности.

Энкеф
ющие сле
Н-тир-гли
гли-фен-л
ния был
hes J. et
логическ
еще в дв
Terenius
теленка
Моле
При то
и лей-эн
мах хл
(60 : 30 :
и 0,48; э
метанол
и 0,74.
трипсин
А. В то
на их ак
Знач
ператур
действи
mantov
сона ил
лей-энк
фина в
провожд
ную фр
ные от
Так, ме
энкефа
ного н
[³H]-д
ду соб
ченных
лиганд
инкуба
до 25 °
гибиру
пени м
и анта
этих у

Энкефалины представляют собой пентапептиды, имеющие следующую аминокислотную последовательность: Н-тир-гли-гли-фен-мет-ОН (мет-энкефалин) и Н-тир-гли-гли-фен-лей-ОН (лей-энкефалин). Впервые эти соединения были выделены из головного мозга свиньи [Hughes J. et al., 1975]. Пептиды с аналогичными фармакологическими свойствами в том же году были получены еще в двух лабораториях [Pasternak G. W. et al., 1975; Terenius L., Wahlstrom A., 1975] из гомогенатов мозга теленка и крысы.

Молекулярная масса энкефалинов составляет 1000. При тонкослойной хроматографии значения R_F для мет- и лей-энкефалинов равнялись соответственно в системах хлороформ — метанол — 20% раствор аммиака (60 : 30 : 5 — здесь и далее объемные отношения) 0,47 и 0,48; эталон — вода (7 : 3) — 0,78 и 0,80; хлороформ — метанол — 20% раствора аммиака (60 : 45 : 20) — 0,75 и 0,74. Энкефалины чувствительны к действию хемотрипсина, лейцинаминопептидазы и карбоксипептидазы. А. В то же время трипсин и нейраминидаза не влияют на их активность.

Значительный интерес представляют данные о температуре и ионном составе среды, влияющих на взаимодействие энкефалинов с опиатными рецепторами [Simantov R., Snyder S. H., 1976]. Инкубация [^3H]-налоксона или [^3H]-дигидроморфина в присутствии мет- и лей-энкефалинов, а также немеченых налоксона и морфина в среде без добавления ионов натрия (рН 7,7) сопровождается ингибцией включения метки в мембранную фракцию тканей мозга крыс. Найдены определенные отличия энкефалинов по изучаемым параметрам. Так, мет-энкефалин оказался в $2\frac{1}{2}$ раза активнее лей-энкефалина по способности уменьшать связывание меченого налоксона, в то время как в экспериментах с [^3H]-дигидроморфином оба пептида не отличались между собой. При 0 °С и +10 °С ингибция связывания меченых препаратов при внесении в систему немеченых лигандов остается постоянной в течение всего периода инкубации (от 15 до 180 мин). Повышение температуры до 25 °С ведет к зависимому от времени снижению ингибирующих свойств лей-энкефалина и в меньшей степени мет-энкефалина. Ингибция связывания агониста и антагониста при добавлении морфина и налоксона в этих условиях остается постоянной. При 37 °С происхо-

дит дальнейшее снижение ингибиторных свойств энке-
фалинов. Напрашивается вывод, что при повышенной
температуре инкубации меченые лиганды довольно лег-
ко вытесняют энкефалины из специфических связываю-
щих мест. Это, однако, не единственное и не самое су-
щественное объяснение наблюдаемого феномена.

Другим важным аспектом снижения ингибиторных свойств энкефалинов является их быстрая деградация в среде инкубации с потерей активности. Действительно, при температуре инкубационной среды 25 °С за 40 мин разрушается около 80% присутствующего лей-энкефалина и 73% мет-энкефалина. Еще более быстрый распад этих пептидов происходит при 37 °С, когда уже через 20 мин инактивируется 85% лей-энкефалина и 65% мет-энкефалина. Существует возможность защиты энкефалинов от разрушения. В частности, подобный эффект получен при добавлении в инкубационную смесь альбумина, который, однако, сам по себе снижает взаимодействие [³I]-налоксона с опиатным рецептором на 15—20%. Более чистые опыты с аналогичными целями удастся поставить при внесении в систему бацитрацина, ингибирующего активность пептидаз, в количестве 10 или 50 мкг/мл. В этих условиях антибиотик сам по себе не оказывает влияния на взаимодействие [³I]-налоксона с опиатным рецептором и имеет место дозозависимое сохранение ингибирующих эффектов энкефалинов, коррелирующее со снижением степени распада этих биологически активных пептидов.

В плане анализа связывания энкефалинов с опиатными рецепторами весьма существенно влияние на этот процесс одновалентных и двухвалентных катионов. Именно им, как мы отмечали ранее, принадлежит важная роль в дифференциации агонистических и антагонистических свойств молекул. Энкефалины также не составляют исключения из этого правила. Установлено, что Na^+ в большей степени ингибирует связывание лей-энкефалина с опиатными рецепторами по сравнению с мет-энкефалином.

Проведено также изучение влияния различных ионов на способность лей- и мет-энкефалинов ингибировать связывание [3 H]-налоксона с опиатными рецепторами в условиях, исключающих распад пептидных молекул (при 0 °C). В этом случае добавление Na⁺ вызывает существенное уменьшение ингибиции энкефалинами свя-

зывания антагонистов, добавлении лигандов в растворах. Ионы кальция в степени меняли свойства последних. Магния, кобальта, никеля, цинка, меди, кадмия, молибдена, вносимые в концентрации, способствовали связыванию. В то же время, ионы натрия, калия, аммония, хлора, брома, йода, фтора, фосфора, серы, азота, углерода, кислорода, водорода, гелия, не влияли на связывание. [10].

В последующем подробно проработана с описаниями [Simantov R. 1978] мет-энкефалина при 25 °С со скоростью 1 м/мин через 30 мин. Бацитрацин был добавлен до 0 °С, максимальное спекание произошло при 10 °С, цептормидом при 10 °С, специфическим при 10 °С и рН 8,5. Кривые мет-энкефалина были получены в среде 90% этилового спирта, вызывание, изотермическое мет-энкефалина, концентрации мет-энкефалина, записались кривые двух связываний.

зывания антагониста. Сходный эффект был получен при добавлении лития в среду в увеличивающихся концентрациях. Ионы калия, цезия и рубидия в незначительной степени меняли параметры связывания. В отличие от последних внесение в систему двухвалентных катионов магния, кобальта и особенно марганца в очень низкой концентрации (порядка 0,25 мМ) повышало ингибиторную способность лей- и мет-энкефалинов по отношению к связыванию [^3H]-налоксона с опиатными рецепторами. В то же время Na^+ в значительной степени повышает способность энкефалинов подавлять специфическое связывание [^3H]-дигидроморфина. Причем эта ингибция весьма различна, и у лей-энкефалина она составляет примерно 20%, в то время как у мет-энкефалина достигает 250%. Приведенные данные, таким образом, ясно свидетельствуют, что по отношению к опиатному рецептору энкефалины ведут себя как агонисты и по параметрам связывания напоминают морфин. В то же время, если сравнивать эффекты Na^+ на связывание чистого агониста, каковым является дигидроморфин, и энкефалинов, то у последних можно отметить, особенно у мет-энкефалина, и смешанные свойства (агонист-антагонист). В этом заключается одно из существенных отличий двух пептидов анальгетиков.

В последующем в лаборатории S. H. Snyder было подробно проанализировано связывание [^3H]-мет-энкефалина с опиатными рецепторами мозга самцов крыс [Simantov R. et al., 1978]. Отмечено, что инкубация меченого мет-энкефалина с мембранной фракцией мозга при 25 °C сопровождается появлением пика [^3H]-тирозина через 35 мин, что указывает на распад пептида. Бацитрацин так же, как и понижение температуры среды до 0 °C, предотвращает распад энкефалина. Максимальное специфическое связывание пентапептида с рецептором регистрируется при pH 7,7. В меньшей степени специфическая ассоциация имеет место при pH 7,0 и pH 8,5. Кривая специфического связывания [^3H]-мет-энкефалина выходит на плато при концентрации пептида в среде 9 нМ (рис. 12, А). Неспецифическое же связывание, измеренное в присутствии 1 мкМ немеченого мет-энкефалина, возрастает линейно при увеличении концентрации меченого пептида. Очень интересными оказались кривые Скетчарда, на которых видно наличие двух связывающих участков при взаимодействии мет-эн-

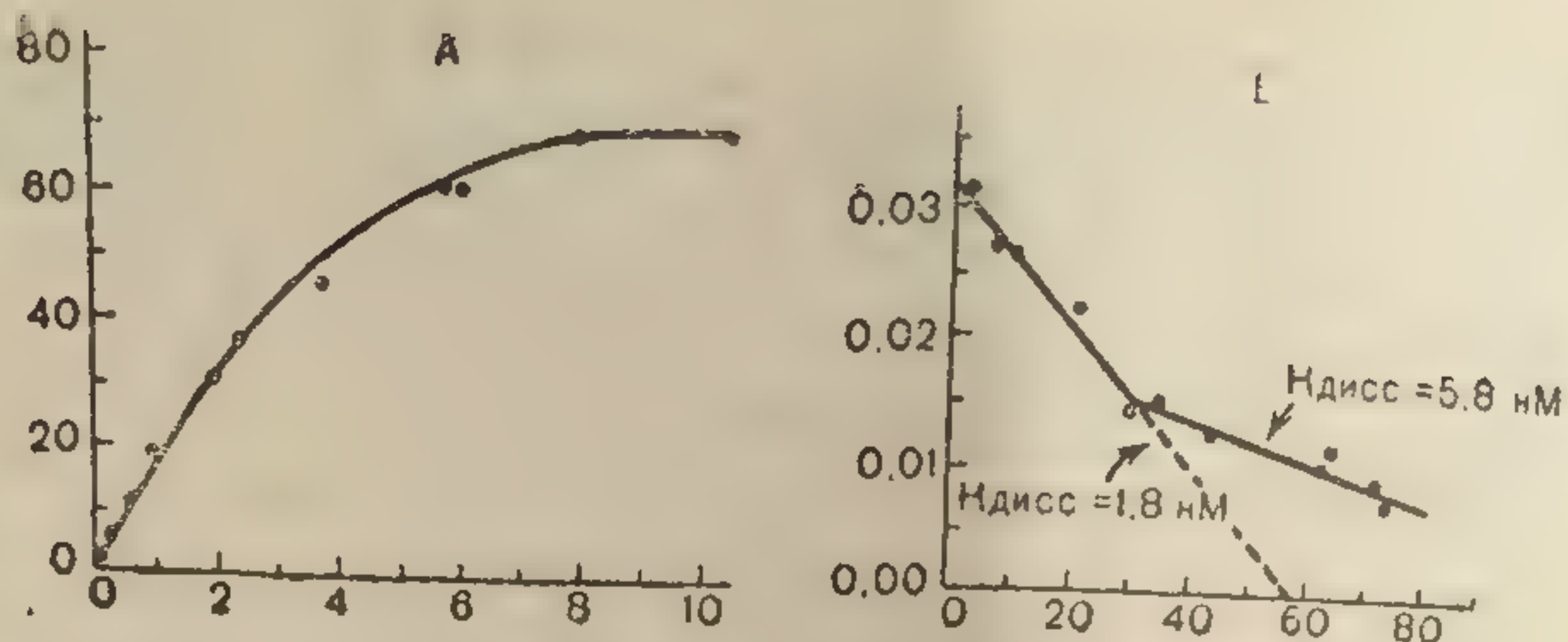


Рис. 12. Насыщаемое связывание $[^3\text{H}]$ -мет-энкефалина с мембранами мозга крыс.

А — сатурационные кривые специфического связывания в присутствии 1 мкН немеченого мет-энкефалина. На оси абсцисс — $[^3\text{H}]$ -мет-энкефалин (нМ); на оси ординат — связанный $[^3\text{H}]$ -мет-энкефалин (пМ); Б — анализ данных по специфическому связыванию в координатах Скетчарда. На оси абсцисс — $[B]$ (пМ); на оси ординат — $[B]/[G]$ (пМ), где В — концентрация связанного $[^3\text{H}]$ -мет-энкефалина (нМ); Г — концентрация $[^3\text{H}]$ -энкефалина в среде инкубации (пМ). K_{diss} рассчитана из наклона соответствующих прямых.

кефалина со специфическими рецепторами (рис. 12, Б). Это наблюдение указывает, что отдельные участки молекулы энкефалина связываются с различными местами опиатного рецептора.

Исходя из модели опиатного рецептора, предложенной S. H. Snyder, можно полагать, что остаток тирозина молекулы энкефалина ведет себя как фенольное кольцо опиатов. В то же самое время фенилаланин, присутствующий в молекуле пентапептида, взаимодействует с другим участком специфического связывания на опиатном рецепторе. Это определяет особенности конкурентного вытеснения молекулы энкефалина из рецепторной ассоциации опиатов. Наличие двух участков связывания у энкефалина может свидетельствовать в определенной степени о достаточной гибкости молекулы.

Изучение структуры мет- и лей-энкефалинов при помощи ЯМР-спектроскопии показало, что в водном растворе диметилсульфоксида имеется несколько конформаций молекул энкефалина. На основании анализа химических сдвигов в ЯМР-спектре молекулы, а также оценки времени спин-решетчатой релаксации и константы спин-спиновых взаимодействий определены торсионные углы в молекулах мет- и лей-энкефалинов и построена теоретическая модель молекул пентапептидов в растворе [Anteunis M., Laba A. H., 1976; Garbay-Jauregiberry C. et al., 1976].

Ввиду того что для получения наиболее разрешимых ЯМР-спектров в различных лабораториях запись проводилась при различных температурах, результаты ряда исследований несколько различаются. Однако во всех случаях продемонстрировано, что молекула энкефалина представляет собой β -складчатую структуру, в которой, по данным одних работ, регистрировался изгиб пептидного скелета между гли³-фен⁴ с образованием водородной связи между NH-группой метионина и СО-группой гли². Указанные особенности выявлялись на основании химических сдвигов амидных протонов при различной температуре, что характеризует их участие в образовании водородных связей внутри молекулы.

Показана также относительно высокая подвижность N-терминального конца молекулы в районе тир¹-гли² пептидной связи [Barbay-Jareginberry C. et al., 1976, 1977].

Другими исследователями определена ограниченная подвижность боковой цепи тирозина по отношению к пептидному скелету молекулы и высокая подвижность боковых цепочек фенилаланина и метионина. Эти данные были получены при анализе времени T_1 спин-решетчатой релаксации в растворе диметилсульфоксида и тяжелой воды. Найденное отношение времени релаксации составляло 2,3, что хорошо согласуется с отношением вязкости диметилсульфоксида и D_2O , равным 2,2. У высокоподвижных атомов фенилаланиновой боковой цепочки (δ , γ , ϵ) и метионина отношение времени релаксации было близко к 1, так как оно определяется их собственной подвижностью относительно пептидной цепочки, а не общей подвижностью молекулы [Blech H. E. et al., 1976].

Авторы полагают, что относительно низкая подвижность тирозина необходима для связывания с активным центром рецептора, а гидрофобные цепочки фенилаланина и метионина, взаимодействуя с гидрофобным участком опиатного рецептора, фиксируют молекулу энкефалина в этом положении. Расчет энергий конформаций молекул мет- и лей-энкефалинов и данные ЯМР-спектроскопии показали, что в растворе воды и диметилсульфоксида можно определить две наиболее выгодные конформации этих молекул (рис. 13). Одна из них имеет водородную связь между гидроксилом тирозинового кольца и СО-группой гли³, незаряженную NH_2 -группу

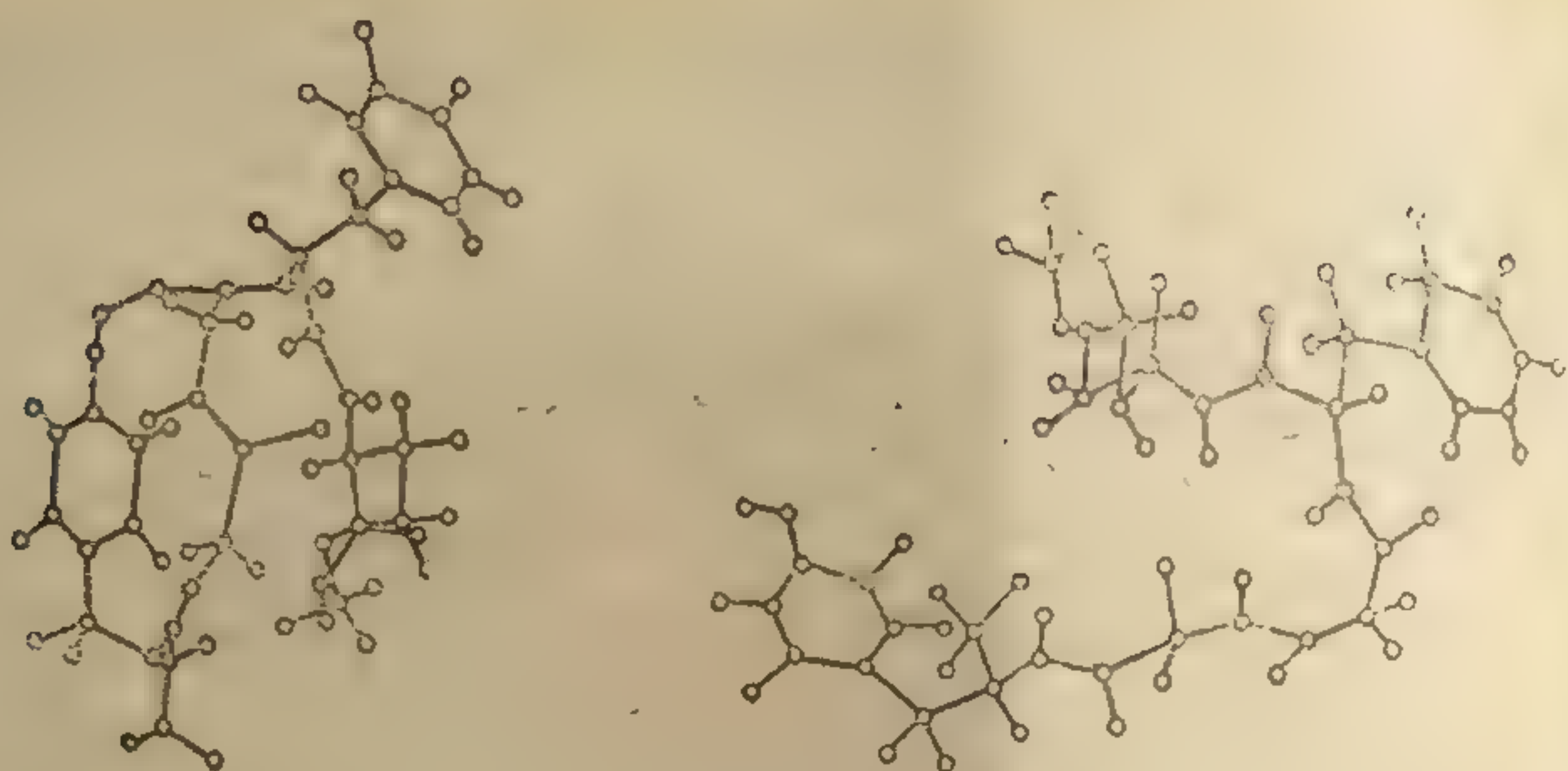


Рис. 13. Две наиболее предпочтительные конформации молекулы лей-энкефалина.

тирозина [Isogai Y. et al., 1977]. Эта конформация имеет преимущество в 5 ккал на 1 моль перед остальными. В подобной конформации, однако, энкефалин не может взаимодействовать с опиатным рецептором, так как для этого необходима OH-группа и положительный заряд на атоме азота тирозина. Вторая — менее энергетически выгодная конформация молекулы энкефалина — характеризуется наличием водородной связи между метионином и гли², а также высокой подвижностью тир¹-гли² участка молекулы. По всей видимости, именно в этой конформации происходит взаимодействие энкефалина с рецептором, так как высокоактивный аналог [D-ала²]-энкефалина имеет в наиболее энергетически выгодном состоянии именно такую конформацию [Mohan F. A., 1977].

Таким образом, хотя для естественных энкефалинов энергетически наиболее выгодна циклическая структура с водородной связью между гидроксильной группой тирозина и СО-группой гли³, взаимодействие с рецептором в реальных условиях осуществляется в менее энергетически выгодной конформации, имеющей водородную связь между NH-группой метионина и СО-группой гли². В подобной конформации гидрофобные боковые цепочки метионина, тирозина и фенилаланина направлены дистально к псевдоциклической пептидной цепочке и расстояние между OH-группой тирозина и атомом азота примерно составляет 0,61 нм. Это соответствует расстоянию между корреспондирующими группами в молекуле морфина. Конформационными различиями молекул энкефалинов можно объяснить и температурную зависимость скоро-

сти связывания так как при изменении конформации молекулы происходит изменение взаимодействия с рецепторами клетки.

Эксперименты показывают, что энкефалины [Simmons, 1977] по сравнению с морфином и при $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ и при 25°C $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ морфина. Молекулы энкефалинов при температуре связывания с рецепторами температуры продемонстрированы антагонистов, Согласно полному комплексу также значительных атомов. Таким образом, скорость ассоциации комплекса с рецептором обусловлено на и происходит при взаимодействии молекулы с жесткой структурой рецепторного сайта.

О выражении энкефалинов со специфическими наблюдениями соединения гидроморфина по способности мет-энкефалина специфически связываться с рецепторами морфина и нальбуфина. Лишь небольшая часть энкефалинов и в меньшей степени морфина и нальбуфина.

сти связывания энкефалинов с опиатными рецепторами, так как при понижении температуры затруднен переход в конформацию, необходимую для специфического взаимодействия с цитоплазматической мембраной нервной клетки.

Экспериментальные наблюдения косвенно подтверждают заключение о выраженной гибкости молекул энкефалинов [Simantov R. et al., 1978]. Так, скорость ассоциации [^3H]-мет-энкефалина с рецептором замедлена по сравнению с [^3H]-налоксоном или [^3H]-дигидроморфином и при 0°C составляет соответственно $1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $0,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ и при 25°C — $9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ для энкефалина и $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ как для налоксона, так и для дигидроморфина. Можно видеть, что данный эффект зависит от температуры — наблюдается 8-кратное замедление скорости связывания [^3H]-мет-энкефалина при понижении температуры от $+25$ до 0°C . Сходные результаты были продемонстрированы при анализе скорости диссоциации антагонистов, агонистов и мет-энкефалина из рецептора. Согласно полученным данным, для мет-энкефалина она также значительно ниже, чем для исследованных опиатов. Таким образом, у мет-энкефалина снижена как скорость ассоциации, так и скорость диссоциации из комплекса с рецептором. Полагают, что это может быть обусловлено меньшей ригидностью молекулы энкефалина и происходящими конформационными изменениями в ней при взаимодействии с рецептором. В то же время молекулы опиатов обладают в достаточной степени жесткой структурой и не изменяют конформации при рецепторном связывании.

О выраженных отличиях во взаимодействии энкефалинов со специфическими рецепторами свидетельствуют и наблюдения по вытеснению меченых лигандов немечеными соединениями. Такие опиаты, как морфин, дигидроморфин и оксиморфон, на порядок менее активны по способности вытеснять из рецепторного связывания мет-энкефалин по сравнению с их потенцией обращать специфические взаимодействия с рецептором дигидроморфина и налоксона. Последний также в значительно меньшей степени вытесняет пентапептид из рецептора. Лишь немногие опиаты, такие, как леваллорфан, циклазоцин и в меньшей степени дипренорфин и эторфин, одинаково легко конкурируют за специфические места

связывания энкефалина, агониста и антагониста. Подобными же свойствами обладает и β -эндорфин. Немечетные мет- и лей-энкефалины весьма активно конкурируют за связывание с мет-энкефалином и менее значительно за связывание с дигидроморфином и налоксоном. В последнем случае следует заметить, мет-энкефалин более чем в 10 раз активнее лей-энкефалина — еще одно подтверждение наличия антагонистических свойств у мет-аналога.

Обращает на себя внимание практически полное отсутствие аффинитета у декстраллорфана к энкефалин-связывающему месту на рецепторе. Это свидетельствует о стереоспецифическом взаимодействии мет-энкефалина с опиатным рецептором, так как оптически неактивный изомер не влияет на связывание. При повышении концентрации Na^+ в среде мет-энкефалин ведет себя как агонист, так как уменьшается его сродство к рецептору и способность вытеснять налоксон из специфических мест связывания.

Оценивая взаимодействие энкефалинов с опиатными рецепторами, необходимо иметь в виду еще ряд факторов, модифицирующих этот процесс. К ним, в частности, относится различная занятость рецепторов эндогенными лигандами у отдельных видов животных. Иллюстрируя это положение, можно сослаться на данные Т. Т. Chau-Phan и W. L. Dewey (1977), которые изучали влияние мет-энкефалина на стереоспецифическое связывание дигидроморфина и налоксона в головном мозге мышей и крыс. Авторы установили, что молярные концентрации энкефалина, вызывающие ингибцию включения $[\text{}^3\text{H}]$ -дигидроморфина на 50% (температура инкубации 0°C), в гомогенатах мозга мышей Swiss-Webster составили $2,6 \times 10^{-12}$ М, а крыс Sprague-Dawley — $1,4 \times 10^{-10}$ М в тех же условиях. Для налоксона эти значения равнялись $6,5 \times 10^{-9}$ М и $1,0 \times 10^{-6}$ М соответственно.

Интересной находкой в этих экспериментах оказалось значительное повышение ID_{50} энкефалина при использовании отмытых мембранных фракций в среде инкубаций вместо гомогенатов мозга мышей ($1,0 \times 10^{-10}$ М для ингибции связывания дигидроморфина и $2,2 \times 10^{-8}$ для налоксона). Добавление супернатанта в среду, содержащую отмытые мембраны клеток мозга, восстанавливало свойства целого гомогената. В мозге крыс эти различия были выражены в значительно меньшей сте-

пени. Такие эндогенные действия и дозирования рецепторов.

Какие фалинов рецепторы при проведении gan и социализации иннаптосом инкубации лей- и мет-энкефалинов держивают? Такие соглашения (1976).

Следующий лиганда температурных экспериментов мет- и лей-энкефалины выражаемые пентапептидами. Кроме того, вие бациллы энкефалина специфически экспрессируют интегративные химические активности.

Анализ но сделана организация являть в В то же время идных пептидов изменениям к рецептору цепочки вызывающие изменения существующие

пени. Таким образом, количественные вариации уровня эндогенных лигандов весьма существенны для взаимодействия с опиатными рецепторами экзогенных соединений и должны обязательно учитываться при интерпретации результатов экспериментов.

Какие же особенности молекул естественных энкефалинов обеспечивают их специфическое связывание с рецептором? Подробные исследования в этом направлении проводились L. Tegenius и соавт. (1976), В. А. Morgan и соавт. (1976). При использовании метода регистрации ингибции включения [^3H]-дигидроморфина в синаптосомальную фракцию мозга крыс (рН 7,4, время инкубации 40 мин при 25 °С) установлено, что молекулы лей- и мет-энкефалинов отличаются по способности задерживать ассоциацию меченого агониста. Это наблюдение согласуется с данными R. Simantov и S. H. Snyder (1976).

Следует помнить, что степень ингибции связывания лиганда с рецептором зависит от рН среды, времени и температуры инкубации. Не исключено, что в описываемых экспериментах проявляется неодинаковое сродство мет- и лей-энкефалинов к опиатному рецептору, которое выражается в различной кинетике взаимодействия этих пентапептидов со специфическими местами связывания. Кроме того, при продолжительной инкубации в отсутствие бацитрацина может происходить ферментный гидролиз энкефалинов с вытеснением пептидных молекул из специфических мест связывания. Оговаривая особенности эксперимента, следует подчеркнуть, что значительный интерес представляют полученные данные о связи химической структуры энкефалинов с их биологической активностью (табл. 3).

Анализируя результаты, приведенные в табл. 3, можно сделать вывод, что существует некая «критическая» организация структуры пептида, позволяющая ему проявлять выраженный аффинитет к опиатному рецептору. В то же время вариации аминокислотного состава опиоидных пептидов и длины молекулы сопровождаются изменениями биологических свойств, поддающихся логическому осмыслению. В частности, увеличение пептидной цепочки как в N-конце (3), так и в C-конце (4,15) не вызывает выраженной потери активности пептида. Внутренние же перестройки молекулы энкефалина весьма существенны. Так, удлинение цепочки всего на один

Таблица 3

Сравнительное сродство различных пептидов к опиатным рецепторам синаптических мембран из головного мозга крыс

Исследованное вещество	Сравнительное сродство к опиатным рецепторам, %
Тир-гли-гли-фен-лей (1)	100
Тир-гли-гли-фен-мет (2)	300
Тир-тир-гли-гли-фен-лей (3)	100
Тир-гли-гли-фен-лей-лей (4)	60
Тир-гли-гли-гли-фен-лей (5)	15
Тир-гли-фен-лей (6)	<1
Тир-гли-гли-фен (7)	7
Гли-Гли-фен-лей (8)	<1
Ди-Ј-тир-гли-гли-фен-лей (9)	<1
Тир-гли-гли-тир-лей (10)	3
Фен-гли-гли-фен-лей (11)	3
Тир-ала-гли-фен-лей (12)	3
Тир-гли-ала-фен-лей (13)	6
Тир-ала-ала-фен-лей (14)	<1
Тир-гли-гли-фен-мет-три-сер-глу-лиз (15)	300
Морфин ($K_{дисс.} = 10^{-9}$ в данной системе)	800

аминокислотный остаток (5) значительно снижает способность пептида взаимодействовать с опиатным рецептором. Аналогичный эффект проявляется и при незначительном укорочении молекулы энкефалина (6,7), хотя в последнем случае и в меньшей степени. Потеря аффинитета к рецептору моделируется также замещением молекул второго и третьего глицина (в большей степени и того, и другого) на аланин (12, 13, 14). Однако наиболее выраженное нарушение детерминируется изменением, затрагивающими остатки тирозина и/или фенилаланина (8, 10, 11). Присоединение двух молекул йода в ортоположении к фенольному гидроксилу также ведет к возникновению неактивного аналога энкефалина. Последнее подтверждает правило, согласно которому любой активный опиат имеет фенильный гидроксил. Наличие этих общих структур в молекулах опиатов и энкефалинов является совсем не случайным и в определенной степени отражает их общее свойство взаимодействовать с опиатными рецепторами. Изменение активности молекулы энкефалина при различных внутренних замещениях указывает на детерминированность биологических свойств конформационными особенностями,

создающим
ствия с ре
Следую
турно-акти
ся воспрои
тов при и
иной степе
вопроса уд
vas deferen
морских св
правления,
[Morgan B
Установ
С-терминал
почти полн
га. Тот же
остатка ме
мещение м
цин не сопр
ности в от
наблюдает
вздошную
идных сво
когда в мо
на фенила
зин. Не ак
рапептид,
из молекул
Авторы
легкая тра
чески акти
мым комп
соединения
ющих проц
Эндорф
единений в
ными в ла
принадлеж
(название
ку экстрак
гормонов, I
лучили экс
выраженно
рата подвз

создающими основу для комплементарного взаимодействия с рецептором.

Следующим важным этапом в расшифровке структурно-активных взаимоотношений энкефалинов является воспроизведение известных физиологических эффектов при использовании модифицированных в той или иной степени пептидных молекул. Для решения этого вопроса удобно использовать регистрацию сокращений *vas deferens* мышей или препарата подвздошной кишки морских свинок. Исследования, проведенные в этом направлении, подтвердили ряд важных закономерностей [Morgan B. A. et al., 1976].

Установлено, что замещение молекулы метионина в С-терминальном конце энкефалина на глицин вызывает почти полную потерю биологической активности аналога. Тот же результат зарегистрирован и при удалении остатка метионина из молекулы активного пептида. Замещение молекулы метионина в мет-энкефалине на лейцин не сопровождается снижением биологической активности в отношении *vas deferens* мышей, в то же время наблюдается 60% снижение эффекта препарата на подвздошную кишку морских свинок. Исчезновение опиоидных свойств пептида наблюдается и в том случае, когда в молекуле мет-энкефалина тирозин замещается на фенилаланин или, напротив, фенилаланин на тирозин. Не активен в биологическом отношении также тетрапептид, получающийся в случае удаления тирозина из молекулы энкефалина.

Авторы справедливо замечают, что такая быстрая и легкая трансформация молекулы энкефалина из биологически активной в неактивную форму является необходимым компонентом естественного существования этого соединения как эндогенного регулятора быстро протекающих процессов в ЦНС.

Эндорфины. Начало интенсивного изучения этих соединений во многом определилось работами, выполненными в лаборатории А. Goldstein. Этому коллективу принадлежит и утвердившийся термин «эндорфины» (название предложено Е. I. Simon). Используя технику экстракции, применяемую для выделения пептидных гормонов, Н. Teschemacher и соавт. в начале 1975 г. получили экстракт из гипофиза быка, который обладал выраженной опиоидной активностью. На модели препарата подвздошной кишки морских свинок и *vas deferens*

мышей продемонстрированы агонистические свойства полученного соединения. Оказалось, что эффект экстракта был аналогичен действию норморфина на подвздошную кишку морских свинок и блокировался налоксоном. Предварительное добавление налоксона в инкубационную среду также предотвращало действие экстракта гипофиза. Сходные эффекты были выявлены и на *vas deferens* мышей с той разницей, что налоксон не полностью предотвращал или ингибировал действие экстракта.

Было получено и прямое экспериментальное доказательство стереоспецифичности экстракта по отношению к опиатному рецептору. Так, добавление гипофизарного экстракта в реакционную систему, содержащую синаптические мембраны мозга морских свинок (опиатные рецепторы), ингибировало стереоспецифическое связывание эторфина на 89% и налоксона на 65%. Внесение Na^+ в среду уменьшало эффект экстракта на связывание налоксона. Для уточнения свойств выделенного экстракта была проведена его некоторая очистка [Сох В. М. et al., 1975]. Установлено, что эндогенный лиганд, названный авторами в то время гипофизарным опиоидным пептидом, имеет молекулярную массу 1750, легко диализуется, устойчив к нагреванию до 100°C в течение 30 мин, не теряет своих свойств в 0,25 М растворах NHCl и NaOH . Продemonстрированы также и первые результаты по устойчивости опиоидного пептида к ферментативной деградации. Инкубация его с α -цитотрипсином и трипсином сопровождается потерей активности; в то же время карбоксипептидазы А и В не влияют на взаимодействие соединения с опиатным рецептором. Для уточнения возможных кандидатов на роль эндогенного лиганда авторы исследовали опиоидную активность у ряда белковых и пептидных гормонов; синтетические молекулы АКТГ и α -МСГ человека, лизин-вазопрессин, окситоцин, лютеинизирующий гормон, субстанция Р, про-лей-глу-NH (mSH-RII) и соматостатин, которые за исключением соматостатина не взаимодействовали с рецепторами опиатов. Последний составлял некоторое исключение, так как в определенной степени угнетал сокращение подвздошной кишки морской свинки, однако его эффект не блокировался налоксоном.

Таким образом, была создана экспериментальная база для дальнейшего поиска эндогенных пептидных соединений с опиоидными свойствами. Этим воспользо-

вался А. С. удачную по искусственно можно, опиатов. В кафанол в трпредположденных кной активможно до крупных м специфиче ра, а остал

Исходя тапептид слотных остлученная опиоидным В то же в опиоидный В последу кислотную но, наско к реально туры энке ускорило свойств и

Действ лось, что включена и идентич предполож сообщить Но этого добный ф что со вр получены наковой

Тести ства сраз ре 1976 менты 61 подобной соединени

вался А. Goldstein и соавт. (1975), которые сделали удачную попытку на чисто теоретической основе создать искусственный пептид, повторяющий, насколько это возможно, основные конформационные особенности опиатов. В качестве базовой модели был выбран норлеворфанол в трехмерном пространстве. Авторы исходили из предположения, что поскольку молекулярная масса найденных к тому времени пептидных лигандов с опиоидной активностью колеблется в пределах 2300—1000, то можно допустить, что лишь небольшой район более крупных молекул непосредственно взаимодействует со специфическим местом связывания опиатного рецептора, а остальные участки несут вспомогательные функции.

Исходя из этих предпосылок, был синтезирован гептапептид со следующей последовательностью аминокислотных остатков: Н-тир-гли-гли-гли-лиз-мет-гли-ОН. Полученная молекула, как и предполагалось, обладала опиоидными свойствами, хотя и была малоактивна. В то же время важно подчеркнуть, что это был первый опиоидный пептид с известной химической структурой. В последующем, когда J. Hughes расшифровал аминокислотную последовательность энкефалинов, стало ясно, насколько теоретическое предвидение было близко к реальности. Вместе с тем выявление химической структуры энкефалинов дало мощный толчок и значительно ускорило изучение структуры, физико-химических свойств и биологической активности эндорфинов.

Действительно, при ближайшем рассмотрении оказалось, что пептидная цепочка мет-энкефалина как бы включена в молекулу β -липотропного гормона (β -ЛТГ) и идентична 61—65 его фрагменту. Естественно было предположить, что наличие указанного фрагмента может сообщить самой молекуле β -ЛТГ опиоидную активность. Но этого в действительности не происходит. Однако подобный факт не озадачил исследователей. Дело в том, что со времени открытия β -ЛТГ С. Н. Li в 1964 г. были получены различные фрагменты этого пептида с неодинаковой биологической активностью.

Тестирование фрагментов β -ЛТГ на опиоидные свойства сразу же принесло ожидаемые результаты. В январе 1976 г. были выделены пептиды, содержащие фрагменты 61—76 и 61—77 β -ЛТГ с выраженной морфиноподобной активностью [Guillemin R. et al., 1976]. Эти соединения получили название α - и γ -эндорфинов. За-

тем, в следующем месяце, С. Н. Li и D. Chung (1976) при изоляции меланотропного гормона выделили С-концевой фрагмент молекулы β -ЛТГ, содержащий 31 аминокислотный остаток (от 61 до 91), обладавший значительной опиоидной активностью (унтриакоптапептид, β -эндорфин). Результаты этих исследований были включены и в другие публикации [Cox B. M. et al., 1976; 1976a]. Практически одновременно этот пептид был обнаружен в гипофизе свиньи [Bradbury A. F. et al., 1976, 1976a; Graf L. et al., 1976], человека [Chretien M. et al., 1976; Li C. H. et al., 1976] и позже овцы [Seidah N. G. et al., 1977].

Структурное сходство эндорфинов и мет-энкефалина можно проиллюстрировать следующей схемой на примере С-концевого фрагмента (61—91) β -ЛТГ свиньи:

Н-тир-гли-гли-фен-мет	-ОН (мет-энкефалин)
Н-тир-гли-гли-фен-мет	-тре-сер-глу-лиз-сер-гли-тре- про-лей-вал-тре-ОН (α -эндорфин)
Н-тир-гли-гли-фен-мет	-тре-сер-глу-лиз-сер-гли-тре- про-лей-вал-тре-лей-ОН (γ -эндорфин)
Н-тир-гли-гли-фен-мет	-тре-сер-глу-лиз-сер-гли-тре- про-лей-вал-тре-лей-фен-лиз- асп-ала-иле-вал-лиз-асп-ала- гис-лиз-лиз-лиз-глу-гли-ОН (β -эндорфин)

Необходимо отметить, аминокислотный состав эндорфинов находится в зависимости от источника выделения препарата. Известно, что молекулы белковых и пептидных гормонов имеют видовую специфичность, и поэтому эндорфины гипофиза человека, свиньи, верблюда и других несколько различаются между собой по 23, 27 и 31-му аминокислотному остаткам:

Человек	Н-тир-гли-гли-фен-мет-тре-сер-глу-лиз-сер-гли-тре-про-лей-вал-тре-лей-фен-лиз-асп-ала-иле-иле-лиз-асп-ала-тир-лиз-лиз-глу-глу-ОН
Свинья	вал
Овца,	гис
верблюд	гис
	гли-ОН
	гли-ОН

Подобные вариации аминокислотного состава не влияют на аффинитет β -эндорфина к опиатному рецеп-

тору. Это с-
тивность это
видов и по
на модельн
тов, выделе

Рассмотр
ляющие вза
атов, а след
скую актив
имодействия
фрагментов
дом триптич
зволил полу
ставляющих
данного лиг
ным эффек
время как 6
более актив
ставе фраг
ладал афф
наблюдение
NH₂-группы
на рецептор
нормальных
шественниц
 β -МСГ и β
ское значен

Более п
взаимоотно
ряд существ
к С-термин
последоват
на аминок
морфинопо
Дальнейше
аминокисл
пептида к
когда акти
фина. К по
пяти перв
В то же в
(1977), ам
ственной
Синтетичес

тору. Это обуславливает высокую биологическую активность этого пептида при введении животным разных видов и позволяет оценивать активность эндорфинов на модельных системах с использованием тест-объектов, выделенных из различных лабораторных животных.

Рассмотрим теперь некоторые особенности, определяющие взаимодействие эндорфинов с рецепторами опиатов, а следовательно, и их специфическую биологическую активность как опиоидных пептидов. Анализ взаимодействия β -ЛТГ, выделенного из гипофиза овец, и фрагментов молекулы этого пептида, полученных методом триптического гидролиза с *vas deferens* мышей позволил получить информацию об участии отдельных составляющих в реализации специфического связывания данного лиганда с опиатными рецепторами. Минимальным эффектом обладала молекула β -липотропина, в то время как 61—91-й фрагмент (β -эндорфин) был в 100 раз более активным. Пептид 48—65, имеющий в своем составе фрагмент, соответствующий мет-энкефалину, не обладал аффинитетом к опиатному рецептору. Подобное наблюдение свидетельствует о важной роли свободной NH_2 -группы тирозина для посадки пептидного лиганда на рецептор. Можно допустить, что молекула β -ЛТГ в нормальных физиологических условиях является предшественницей двух гормонально-активных соединений β -МСГ и β -эндорфина, имеющих различное биологическое значение в организме.

Более подробные исследования структурно-активных взаимоотношений в молекуле β -эндорфина выявили еще ряд существенных закономерностей. Отмечено, что если к С-терминальному концу мет-энкефалина добавить в последовательности соответствующей молекуле эндорфина аминокислотные остатки до позиции от 9 до 17, то морфиноподобная активность пептида резко снижается. Дальнейшее удлинение полипептидной цепи до 29-го аминокислотного остатка восстанавливает аффинитет пептида к опиатному рецептору до исходного уровня, когда активность соответствует целой молекуле β -эндорфина. К потере опиоидных свойств ведет также удаление пяти первых аминокислот в молекуле β -эндорфина. В то же время, по наблюдениям L. F. Tseng и соавт. (1977), аминокислотные остатки 6—15 не играют существенной роли в опиоидной активности β -эндорфина. Синтетический пептид, лишенный этого участка, даже

в большей степени ингибирует электростимуляцию, чем сокращение препарата подвздошной кишки у свинки, чем целая молекула естественного опиоидного пептида. Изучение химических особенностей β -эндорфина, проведенное в лаборатории С. Н. Ли [Dorson B. A. et al., 1977], кроме того, продемонстрировало, что циклизация между 1-й и 2-й аминокислотами (тир-гли) почти полностью предотвращает специфическое рецепторное связывание пептида. Подобный эффект выявляется и при замене метионина на гомосерин. Еще одно важное свойство β -эндорфина заключается в значительной резистентности его молекулы к действию некоторых ферментов. Так, после воздействия лейцинаминотрансферазы наблюдается лишь незначительное освобождение тирозина из молекулы, и эта обработка практически не влияет на сродство β -эндорфина к рецептору. Напротив, данный фермент очень легко гидролизует молекулу мет-энкефалина с освобождением тирозина. Мы акцентируем на этом внимание в данном разделе главы, стараясь подчеркнуть тем самым весьма существенное значение указанного факта для понимания различий в физиологических и фармакологических эффектах β -эндорфинов и энкефалинов как по выраженности действия, так и по локализации.

Другие эндогенные лиганды с опиоидными свойствами. Продолжая разговор о морфиноподобных свойствах соединений, обнаруживаемых в гипофизе, следует отметить, что общая активность данных веществ выше, чем теоретически возможная для суммарных эффектов биологически активных, в этом отношении фрагментов β -ЛТГ. Напрашивается вывод о существовании еще по крайней мере одного или нескольких составляющих, обеспечивающих подобное несоответствие. Иначе говоря, опиоидная активность гомогенатов гипофиза не ограничивается только теми соединениями, о которых сказано выше. Действительно, существуют доказательства, подтверждающие это предположение. Одно из них получено в лаборатории А. Goldstein [Cox B. M. et al., 1976] при изучении коммерческих препаратов АКТГ и концентратов β -МСГ с разной степенью предварительной очистки. Исследование хроматографических пиков при разделении этих гормонов выявило три компонента (мол. м. 3200, 2600 и 1750), обладающих морфиноподобными свойствами. Указанные вещества отличались

по свойствам
тету к опиоидным
первые два
последний
да более
чают возм
ды (не об
существенн

В посл
1750 был
подробно
80% этого
пофиза, т
редней до
добную а
дольной
vas deferens
соном. У
[^3H]-нало
ный эффе
Na $^+$ в с
пептида
В отличи
ющего с
генброми
получени
лило авт
тид медл

Извес
энкефали
вами. Та
людей по
ствами.
dine — о
По свои
чался от
этого со
матограс
твор ам
R $_F$ = 0,19
форм —
значения
идный п
тельной

по свойствам от β -эндорфина, в частности, по аффинитету к опиатным рецепторам. Авторы предположили, что первые два пептида существуют реально в гипофизе, а последний пептид, возможно, является продуктом распада более крупных молекул. Кроме того, они не исключают возможности, что некоторые гипофизарные пептиды (не обязательно β -эндорфины) могут являться предшественниками энкефалинов мозга.

В последующем пептид с молекулярной массой около 1750 был выделен из гипофиза свиньи и изучен более подробно [Lowney L. I. et al., 1979]. Оказалось, что 80% этого протеина ассоциировано со средней долей гипофиза, тогда как 68% β -эндорфина определяется в передней доле. Полученное соединение имело морфиноподобную активность при тестировании на препарате продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки и *vas deferens* мыши, причем эффект блокировался налоксоном. Указанный пептид ингибировал связывание [^3H]-налоксона с опиатными рецепторами, однако данный эффект в 5 раз был менее выражен в присутствии Na^+ в среде. Характерной особенностью выделенного пептида является его устойчивость к цианогенбромиду. В отличие от β -эндорфина, практически полностью теряющего специфическую активность в присутствии цианогенбромид в концентрации 250 мг/мл среды, активность полученного соединения не менялась. Последнее позволило авторам назвать вновь открытый опиоидный пептид медленно обратимым эндорфином.

Известны и другие отличающиеся от эндорфинов и энкефалинов эндогенные лиганды с опиоидными свойствами. Так, С. В. Pert и соавт. (1976) выделили из крови людей пептид с выраженными морфиноподобными свойствами. Авторы назвали его анодинином (от англ. *anodyne* — обезболивающее, успокаивающее средство). По своим физико-химическим характеристикам он отличался от мет- и лей-энкефалинов. Молекулярная масса этого соединения равняется 600. При тонкослойной хроматографии в системе хлороформ — метанол — 20% раствор аммиака в объемных отношениях 60 : 30 : 5, его $R_F = 0,19$. В системах этанол — вода (7 : 3) и хлороформ — метанол — 20% раствор аммиака (60 : 45 : 20) значения R_F равнялись соответственно 0,28 и 0,24. Опиоидный пептид из крови людей, как оказалось, в значительной степени менее чувствителен к пептидазам мо:

га и почти не теряет способности к специфическому связыванию при инкубации с мембранной и супернатантной фракцией мозга крыс при 37 °С в течение 1 ч. По способности ингибировать связывание [³H]-налоксона он напоминает морфин. По-видимому, синтез анодинина и его освобождение происходят при участии гипофиза, так как через 1 ч после гипофизэктомии его уровень в плазме крови крыс составляет лишь 5% от значений, определенных у ложнооперированных животных.

При введении анодинина через катетер в серос вещество периакведукта крыс через 1 мин развивается аналгетический эффект в течение 1 ч. В количественном отношении 4 мкл фракции крови, содержащей анодинин, по анальгезирующим свойствам соответствуют 5 мкг морфина, введенному в тот же участок мозга в виде микроинъекции в 4 мкл воды. Как и в случае морфина, эффект анодинина блокируется налоксоном. Приведенные данные свидетельствуют, что анодинин является самостоятельным опиоидным пептидом, который, не подвергаясь быстрой инактивации пептидазами, может регулировать физиологические процессы при взаимодействии с периферическими опиатными рецепторами. Не исключено, однако, что благодаря своим гидрофобным свойствам указанный пептид может проходить через гематоэнцефалический барьер, реализуя эффекты эндогенных опиоидов в определенных структурах головного и спинного мозга. В настоящее время трудно характеризовать источник или предшественник анодинина в гипоталамической области, им может быть две возможности: с одной стороны, им может быть высокомолекулярный пептид с опиоидными свойствами, выделенный в лаборатории А. Goldstein из гипофиза быка (ПОП-1); с другой — могут взаимодействовать в кровяном русле с другими молекулами, формируя «синтетический» пептид со свойствами анодинина.

Если под термином «опиоидные пептиды» понимать наличие у определенных молекул аналгетической активности, то в эту группу веществ можно также включить ундекапептид (субстанцию Р), брадикинин и кальцитонин. Последние, отличаясь от рассмотренных выше соединений неспособностью к специфическому связыванию с классическими опиатными рецепторами, при введении в организм вызывают анальгезию. Подобными же свой-

ствам
пента
(мет-
класс
АРУ
обща
ция [

Пр
гастр
лабор
дающ
участ
ного
вызва
чек м
10 ми
выраж
ным э
зе 200
ность
пепти
рецеп
вздош
в 1000
кефал
1979;

Ан
фрагм
амино
что он
мозга.
внутри
ны и
что, н
фалин
гическ
компл
этого
ческих
те, та
ток ж
дение
ских о
на иде

ствами обладают и С-концевые фрагменты гастрин — пентагастрин (β -ала-трип-мет-асп-фен- NH_2) и трипептид (мет-асп-фен- NH_2). Сам гастрин в настоящее время классифицируется как пептидный гормон, входящий в ARUD-систему, представителей которой характеризует общая гастроинтестинальная и церебральная локализация [Клуша В. Е. и др., 1979].

При использовании специфических антисывороток гастриноподобная активность регистрируется в мозге лабораторных животных и человека, а также в блуждающем нерве. Предполагается, что гастрин принимает участие в регуляции транссинаптической передачи нервного импульса. В отличие от энкефалинов анальгезия, вызванная введением пентагастрина в боковой желудочек мозга (30 мкг), достигает максимума только через 10 мин и продолжается более 45 мин. Несколько менее выраженным, но сходным в динамике антиноцицептивным эффектом, обладает и трипептидный фрагмент в дозе 200 мкг, который проявляет обезболивающую активность и при внутривенном введении. Пентагастрин и трипептидный фрагмент не взаимодействуют с опиатными рецепторами мезентериального нервного сплетения подвздошной кишки морской свинки даже в концентрациях, в 1000 раз превышающих таковые, найденные для энкефалинов в данной тест-системе [Клуша В. Е. и др., 1979; Майский А. И. и др., 1981].

Анализ поведенческих реакций и оценка влияния фрагментов гастрина на содержание биогенных моноаминов в переднем мозге крыс позволили установить, что они взаимодействуют с дофаминовыми рецепторами мозга. Кроме того, в поведенческие реакции, вызванные внутрижелудочковым введением этих пептидов, включены и серотонинергические процессы. Можно полагать, что, несмотря на выявление отличия в действии энкефалинов и гастринов, они относятся к единой физиологической системе регуляции гомеостаза, образуемой комплексом анальгезирующих пептидов мозга. В пользу этого свидетельствуют наблюдения о близости биологических свойств опиоидных пептидов и гастринов. Как те, так и другие повышают функцию секреторных клеток желудка, стимулируют или ингибируют высвобождение гормонов гипофиза и находятся в антагонистических отношениях с тиролиберином. Кроме того, показана идентичность иммунореактивных клеток гастрина и

мет-энкефалина в пилорическом отделе желудка человека и собаки.

Кажется весьма вероятным, что анальгетические эффекты пентогастрина и трипептидного С-терминального фрагмента гастрина, не опосредующиеся через классические опиатные рецепторы, могут проявляться как результирующий эффект воздействия этих соединений на эффекторные области мозга, ответственные за анальгезию. Если же допустить, что наркогенная активность анальгетиков является атрибутом их влияния через опиатные рецепторы, то подробное изучение анальгетических свойств пептидов с отличным от энкефалинов типом действия открывает перспективы поиска психоактивных и обезболивающих препаратов для выявления соединений, лишенных наркогенных свойств или малоактивных в этом отношении.

Достаточное разнообразие эндогенных лигандов, обладающих опиоидными свойствами, по-видимому, не ограничивается рассмотренными выше пептидными молекулами. Существуют наблюдения, выполненные с помощью антисывороток к морфину, указывающие на наличие в ЦНС соединений с морфиноподобным действием и перекрестно реагирующих с антителами к морфину [Gintzler A. R. et al., 1976; Levy A. et al., 1976]. Количество данного морфиноподобного компонента (МПК) неодинаково в различных отделах мозга; выраженное в иммуноэквивалентах морфина (нг/г ткани) оно равно: в ядре 33 ± 10 и 24 ± 7 ; в гипоталамусе $14,4 \pm 4$ и 12 ± 6 ; в мозжечке 12 ± 3 и 14 ± 4 ; в гиппокампе 8 ± 3 и 5 ± 2 ; в среднем мозге 4 ± 1 и $2,7 \pm 1$; в коре 2 ± 1 и $1,5 \pm 0,7$. Кроме этих животных, МПК выявлен в мозге морских свинок, свиней, коров и крыс. Обнаруженное соединение имеет явно не пептидную природу и не теряет способности взаимодействовать с антителами к морфину при инкубации с проназой, трипсином, карбоксипептидазой А и аминопептидазой. Оно также не разрушается в присутствии 0,1 М HCl, NaSO₃ и K₂S₂O₅. Однако подобно морфину МПК легко теряет свои свойства при окислении перекисью водорода и йодом и, кроме того, дает цветную реакцию на фенол. Характерно, что морфин и МПК имеют идентичные значения R_F при тонкослойной хроматографии. В системах бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1 — здесь и далее объемные отноше-

ния) R_F равняется 1; бутанол — бензол — метанол — вода (15 : 10 : 60 : 15) R_F равняется 0,7; хлороформ — ацетон — диэтиламин (5 : 4 : 1) R_F — 0,16; хлороформ — диэтиламин (9 : 1) R_F равняется 0,08. Как и морфин, МПК ингибирует электрически стимулированное сокращение препарата подвздошной кишки морской свинки и *vas deferens* мышей.

Однако в отличие от растительного алкалоида эффект морфиноподобного компонента не блокируется налоксоном или налтрексоном. Это заставляет предположить, что действие МПК или не осуществляется через опиатный рецептор, или у этого соединения аффинитет к рецептору выше, чем у антагонистов опиатов и морфина. Во всяком случае, эти наблюдения открывают еще одну возможность в уточнении фармакологических эффектов опиатов, с одной стороны, и диктуют необходимость дальнейшего изучения значения МПК в физиологии ЦНС.

Локализация, биогенез и метаболизм. Вопросам анализа локализации эндогенных морфиноподобных соединений в организме уделяется большое внимание. Действительно, это одна из центральных комплексных проблем, решение которой позволит максимально приблизиться к пониманию их роли в функционировании ЦНС. Общепризнанные успехи, достигнутые в изучении тонкой организации ЦНС и разграничении функционального значения ее отдельных структур, являются во многом определяющим фактором, когда только обнаружение биологически активного вещества с известным механизмом действия в конкретном ядре или любых других анатомических образованиях головного и спинного мозга в первом приближении уточняет возможные физиологические эффекты и связанные с ними другие реакции органов и систем целого организма. Ценность этих наблюдений возрастает при уточнении генеза биологически активных эндогенных соединений и распределения уровней активности ферментов, способствующих их инактивации.

В общебиологическом плане такой интегральный подход позволяет решить вопрос о значимости вещества (в нашем случае эндогенных морфиноподобных соединений) как кандидатов на роль химических регулирующих факторов. Учитывая гетерогенность опиатных рецепторов, существование эндогенных молекул, обладаю-

щих различной физико-химической структурой и в то же время сходными морфиноподобными свойствами, изложенное выше определяет особую значимость рассматриваемых вопросов. Несколько сужая рамки проблемы в данном разделе, необходимо уточнить, являются ли эндорфины предшественниками энкефалинов или последние синтезируются самостоятельно? Как распределяются эндогенные опиоидные пептиды в организме? Какие ферментные системы нейтрализуют эндогенные лиганды опиатных рецепторов? Хотя ответы на отдельные из этих вопросов в настоящее время не носят исчерпывающего характера, основные закономерности все же в достаточной степени экспериментально обоснованы. По мере выяснения деталей и углубления знаний механизма действия эндогенных опиоидных соединений они, естественно, постоянно расширяются и конкретизируются.

Анализ локализации энкефалинов в ЦНС, проведенный рядом исследователей, показывает, что она в целом совпадает с распределением опиатных рецепторов в различных отделах мозга. В частности, при использовании иммунофлюоресцентного метода в лаборатории S. H. Snyder установлена высокая концентрация энкефалинов, регистрируемая в виде флюоресцентных тяжей в задних канатиках спинного мозга на границе с латеральным краем серого вещества [Simantov R. et al., 1977].

В нижней части продолговатого мозга значительное количество энкефалинов найдено в желатинозной субстанции, комиссуральных ядрах и латеральных зонах ретикулярной формации. На уровне *area postrema* иммунофлюоресценция обнаружена в ядрах одиночного тракта, дорсальных ядрах блуждающего нерва и ядрах подъязычного нерва. В стволе мозга на уровне синей субстанции высокая концентрация энкефалинов определяется в парабрахимальных ядрах и дне IV желудочка. В нижней части среднего мозга наиболее выраженная флюоресценция отмечается в области серого вещества периакведукта с латеральным распространением в полукровную крышку. В несколько меньшей степени она регистрируется в дорсальных и медиальных ядрах срединного шва и рядом с дорсальной частью нижнего двуххолмия. В таламусе иммунофлюоресценция выше в медиально-дорсальном районе, окружающем желудочек. В лате-

рали
ству
конц
кул
ми
риве
мя
ных
флю
ноф
ки.
цент
флю
ра
раль
ные
шаре
флю
мозг
А
зывает
уров
теми
контр
лины
и инт
в инт
ядер
зиоло
лекс
серог
прин
чески
ки и
гулир
опред
боль
далев
витие
М
ных ф
механ
о мно
пепти
6 Заказ

ральных же областях таламуса флюоресценция отсутствует. В срединных ядрах таламуса особенно высокая концентрация энкефалинов обнаружена в перивентрикулярных круглоклеточных ядрах. Богаты энкефалинами и некоторые структуры гипоталамуса, особенно перивентрикулярные и вентральные отделы. В то же время в супраоптических ядрах, сосочковых телах, аркуатных и супрахиазматических ядрах, небольшой уровень флюоресценции. В белом веществе гипоталамуса иммунофлюоресценция выявляется только в области воронки. В районе миндалевидного тела энкефалины сконцентрированы в центральном ядре. Средняя и слабая флюоресценция отмечается несколько латеральнее центра миндалевидного тела в зоне, прилежащей к вентральной части хвостатого ядра и подушки. Значительные уровни энкефалинов выявляются также в бледном шаре и латеральной перегородке. Ограниченные зоны флюоресценции обнаружены также в коре головного мозга крыс.

Авторы полагают, что полученные ими данные указывают на наличие четкой корреляции между высоким уровнем энкефалинов в отдельных областях мозга и теми же структурами ЦНС, функция которых может контролироваться опиатами. Допускается, что энкефалины, локализованные в задних отделах спинного мозга и интраламинарных ядрах таламуса, могут включаться в интеграцию болевой чувствительности. Энкефалины ядер блуждающего нерва в продолговатом мозге в физиологических условиях отвечают за висцеральные рефлексy, в частности за кашлевой и рвотный. В пределах серого вещества периакведукта именно энкефалинам принадлежит решающая роль в формировании электрически стимулированной аналгезии. Энкефалины воронки и перивентрикулярных ядер гипоталамуса могут регулировать эндокринные функции мозга. В пределах определенных областей лимбической системы, коры больших полушарий и особенно центрального ядра миндалевидного тела энкефалины могут отвечать за развитие эйфории.

Мы понимаем, что подобное перечисление возможных функций, контролируемых энкефалинами, несколько механистично, однако оно дает общее представление о многогранных физиологических эффектах этих нейропептидов в ЦНС.

Необходимо иметь в виду, что для тонкого анализа физиологического значения энкефалинов важно знать не только их количественное содержание в определенных отделах ткани мозга, но и качественный состав. В этой связи несомненный интерес представляют исследования, проводимые в лаборатории J. Hughes, где разработан метод, позволяющий экстрагировать опионидные пептиды из различных тканей без разрушения молекул во время выделения [Hughes J., 1978; Hughes J. et al., 1977]. Используя указанную методику, авторы обнаружили, что в экстрактах головного мозга и подвздошной кишки морских свинок 95% опиоидной активности связано с присутствием энкефалинов. Кроме того, при хроматографии выделялся минорный пик, вещество которого проявляло свойства опиоидных агонистов, но по физико-химическим параметрам отличалось от известных ранее энкефалинов и эндорфинов. Молекулярная масса неизвестного соединения, названного ϵ -эндорфином, составляла 800—1200. Ввиду малого количества препарата аминокислотный состав ϵ -эндорфина установить не удалось.

Более точные данные о локализации мет- и лей-энкефалинов были получены при использовании цианогенбромидов. Это соединение подавляет опиоидную активность мет-энкефалина на 91—94%, практически не влияя на анальгетические свойства лей-энкефалина. На основе этого различия регистрация активности энкефалинов до и после обработки цианогенбромидом позволяет легко рассчитать раздельную концентрацию мет- и лей-энкефалинов. Обнаружено четкое соответствие в содержании мет- и лей-энкефалинов в мозге лабораторных животных. Отношение мет-энкефалина к лей-энкефалину у мыши, крысы, морской свинки и кролика колебалось в среднем от 3 до 3,7. Аналогичные наблюдения были сделаны и для различных отделов мозга морских свинок и кроликов. Подавляющее количество этих пептидов содержится в полосатом теле и гипоталамусе, минимальное же — в коре больших полушарий. Выявляются и видовые вариации.

Выявляются и видовые вариации содержания энкефалинов в отдельных областях мозга. Особенно это касается мозжечка. У морских свинок в нем регистрируются лишь следовые количества этих пентапептидов, в то время как у кроликов мет-энкефалин фиксируется в тех же концентрациях, что и в коре больших полу-

шарий. И
ожиданное
лика. Отме
различия в
шении мет
мозга мор
пени подоб
общего со
ном тракте
ет в средн
достигает 1

В связи с этим пользуются свинки, бо-
кефалинов тракта этого пептидов оо-
и подвздош-
чества энке-
жены в же-
стого кише-
кефалинов
ских свинок
этих пептид
ном сплетен
кишки. Мени-
мышечно-му-
ние мет-энк-
ном. Неболь-
ны также в
днях, легки-
предсердиях,
ющем и сед-
энкефалины
а также в ва-
шей. Эти на-
что энкефали-
являть свое
но и на пери-
Возвраща-
пептидов в Л-
может быть в
лах мозга. С-
дыдущие исс-

шарий. Интересной особенностью является также неожиданное отсутствие лей-энкефалина в мозжечке кролика. Отмечаются и другие менее выраженные видовые различия как в содержании энкефалинов, так и в соотношении мет- и лей-энкефалинов в отдельных отделах мозга морских свинок и кроликов. В еще большей степени подобные различия выявляются при определении общего содержания энкефалинов в желудочно-кишечном тракте. В подвздошной кишке мышей оно составляет в среднем 18 пм/г, у крыс — 25 пм/г, а у кроликов достигает 120 пм/г сырой массы органа.

В связи с тем что в эксперименте наиболее часто используются препараты подвздошной кишки морской свинки, более подробно исследовалось содержание энкефалинов в различных отделах желудочно-кишечного тракта этого животного. Максимальные уровни данных пептидов обнаружены в двенадцатиперстной (390 нм/г) и подвздошной (190 нм/г) кишках. Значительные количества энкефалинов (от 60 до 85 нм/г) также обнаружены в желудке, слепой кишке и других отделах толстого кишечника. Оценка концентрации мет- и лей-энкефалинов в различных слоях стенки кишечника морских свинок и кроликов показала, что основная часть этих пептидов ассоциирована в мезентериальном нервном сплетении, иннервирующем прямую мышцу тонкой кишки. Меньшие количества выявляются в циркулярном мышечно-мукозальном слое. Во всех случаях содержание мет-энкефалина превалировало над лей-энкефалином. Небольшие количества мет-энкефалина обнаружены также в почках и печени морских свинок, предсердиях, легких и блуждающем нерве крыс, а также в предсердиях, симпатической нервной цепочке, блуждающем и седалищном нервах кроликов. В то же время энкефалины полностью отсутствовали в крови кроликов, а также в *vas deferens* кроликов, морских свинок и мышей. Эти наблюдения, таким образом, свидетельствуют, что энкефалины в физиологических условиях могут проявлять свое регулирующее влияние не только в ЦНС, но и на периферии.

Возвращаясь к вопросу о локализации опионидных пептидов в ЦНС, необходимо отметить, что различным может быть не только содержание энкефалинов в отделах мозга. Существуют данные, подтверждающие предыдущие исследования в части нахождения морфино-

подобных пептидов, отличающихся по своим свойствам от энкефалинов и известных α -, γ - и β -эндорфинов. Исследованиями Н.-У. Т. Yang и соавт. (1978) установлено присутствие двух пептидов с молекулярной массой в пределах 700—1000 и больше 1800 соответственно для каждого из них. Указанные пептиды локализованы в хвостатом ядре мозга быка и в иммунологических экспериментах дают перекрестную реакцию с антисыворотками к мет- и лей-энкефалинам. Частичный триптический гидролиз этих молекул не только не снижал, но даже, напротив, увеличивал выраженность иммунных реакций с антителами к пентапептидам. Эти наблюдения послужили основанием к заключению, что найденные пептидные молекулы могут являться предшественниками энкефалинов. В пользу данного предположения свидетельствуют также результаты опытов по включению меченых аминокислот.

Как было установлено, уровень инкорпорации меченого глицина в мет-энкефалин весьма растянут во времени и максимален только через 2 ч. Такая длительная задержка становится понятной, если допустить, что вначале происходит синтез более крупной молекулы предшественника и лишь затем вычленение энкефалина. Одно время полагали, что таким предшественником является β -эндорфин, синтезируемый в гипофизе. Однако в настоящий момент превалируют наблюдения, указывающие на самостоятельный синтез энкефалинов в местах локализации их физиологических эффектов.

В этой связи уместно сослаться на наблюдения R. P. Sosa и соавт. (1977), которые в экспериментах *in vitro* с гомогенатами нервно-мышечного препарата прямой мышцы подвздошной кишки крыс продемонстрировали двухфазную динамику включения [^3H]-тирозина в мет- и лей-энкефалины. В первые 2 ч (инициальная латентная фаза) происходит лишь незначительное повышение метки в молекулы опиоидных пептидов. В последующем инкорпорация меченого предшественника резко линейно возрастает в течение 12 ч инкубационного периода. Более значительно, как и следовало ожидать, [^3H]-тирозин включался в молекулу мет-энкефалина. Добавление в инкубационную среду ингибиторов белкового синтеза — пуромицина или циклогексемида, сопровождавшееся резким снижением включения меченой аминокислоты в мет- и лей-энкефалины. В то же время

анализ
не выяв
кишечни
за и пр
лоты в

О не
нах моз
hes (19
доказате
линов в
ских св
ный гид
щался
лей-лей
нов рез
в среде
увеличе
снижени
дорфина
чением
внеклет
энкефал
из срез
(3,4 : 4)
валось
вался т

В те
вопрос
щее вре
следую
арг-(пр
1979]. М
турно с
состав
предшес
вание з
препара
ской св
энксфал
нее лей

анализ включения [^3H]-тирозина в энкефалины мозга не выявил закономерностей, полученных на гомогенате кишечника. В этом случае отсутствовала латентная фаза и происходило более быстрое включение аминокислоты в молекулы энкефалинов.

О непосредственном синтезе энкефалинов в нейронах мозга свидетельствуют также исследования J. Hughes (1978). Автор получил прямое экспериментальное доказательство присутствия молекул мет- и лей-энкефалинов в изолированных срезах полосатого тела у морских свинок и в препаратах синапсом. Ферментативный гидролиз энкефалинов в этих опытах предотвращался добавлением дипептидов тир-тир, лей-гли и лей-лей в перфузионную среду. Освобождение энкефалинов резко возрастало при повышении концентрации K^+ в среде. Этот эффект усиливался при одновременном увеличении уровня Ca^{2+} и, напротив, блокировался при снижении концентрации последнего. Добавление β -эндорфина в среду инкубации не сопровождалось увеличением содержания мет-энкефалина. Следовательно, внеклеточный эндорфин не является предшественником энкефалина. Повышение выхода мет- и лей-энкефалинов из срезов полосатого тела, причем в соотношениях (3,4 : 4), близких к таковым в ткани мозга, индуцировалось вератридином. Этот эффект обратимо блокировался тетродоксином.

В течение длительного времени оставался открытым вопрос о предшественниках лей-энкефалина. В настоящее время из гипоталамуса свиней выделен пептид со следующей структурой: тир-гли-гли-фен-лей-арг-лиз-арг-(про₁, гли₁, тир₂, лиз₂, арг₁) [Kangawa K. et al., 1979]. Можно видеть, что N-конец этой молекулы структурно соответствует лей-энкефалину. Аминокислотный состав пептида значительно отличает его от известных предшественников энкефалинов и эндорфинов. Тестирование этого соединения на опиоидную активность на препарате продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки показало, что он в 6,7 раза активнее мет-энкефалина, в 5 раз — β -эндорфина и в 27 раз активнее лей-энкефалина.

Интенсивные поиски предшественников энкефалинов в мозге привели к открытию целого ряда пептидов, обладающих опиоидными свойствами, таких, как α -нео-эндорфин, динорфин, [арг⁶]-лей-энкефалин, [арг⁶, фен⁷]-

мет-энкефалин, октапептид РН — 8Р, кинорфин и др. В частности, динорфин, выделенный из ткани мозга в лаборатории А. Goldstein (1979), представляет собой пептидную молекулу из 13 аминокислотных остатков (тир-гли-гли-фен-лей-арг-арг-иле-арг-про-лиз-лей-лиз). Существуют веские основания считать, что динорфин, обладающий значительно большей активностью по сравнению с энкефалинами и морфином в отношении ингибции сокращения продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки и имеющий еще целый ряд поведенческих эффектов, не свойственных опиатам и энкефалинам, может являться естественным предшественником лей-энкефалина. Кроме того, на эту же роль претендуют α -неоэндорфин и октапептид РН — 8Р. Оба они в своем составе содержат структурные участки, идентичные лей-энкефалину [Minamino N. et al., 1980].

Наличие нескольких биологически активных предшественников энкефалинов в ткани мозга не получило в настоящее время достаточного биологического объяснения. Можно лишь допустить, что подобный полиморфизм может быть связан с гетерогенностью опиатных рецепторов в отдельных участках мозга и/или различной субстратной специфичностью локально функционирующих регуляторных ферментных систем. Вместе с тем несомненно, что процессинг энкефалинов в организме может осуществляться и непосредственно из аминокислот. Об этом говорят наблюдения L. Тап и Н. Юи (1980), которые показали, что хромафинные клетки коры надпочечника могут синтезировать *de novo*, непосредственно из аминокислот мет-энкефалин, лей-энкефалин и [арг⁶]-лей-энкефалин. Нам представляется вероятным, что процессинг энкефалинов может идти как путем образования высокомолекулярных предшественников, так и посредством сборки готовых молекул на рибосомах соответствующих нейронов или других, компетентных в этом отношении дифференцированных клеток.

Весьма важна оценка возможности регуляции биосинтеза энкефалинов, которая представляет не только общебиологический интерес, но и имеет самостоятельное медицинское значение. В экспериментах на крысах установлено, что хроническое введение галоперидола селективно повышает уровень энкефалинов в полосатом теле и некоторых ядрах мозга [Hong J. S. et al., 1978, 1979].

Это указывает, что в механизме действия эффективных нейролептиков стимуляция уровня энкефалинов, по-видимому, имеет немаловажное значение. Необходимо, однако, выяснить, чем конкретно обеспечивается обнаруженное повышение — увеличением скорости синтеза или уменьшением распада.

Эксперименты с циклогексемидом показали, что различные отделы мозга неоднозначно реагируют на этот антибиотик в плане подавления биосинтеза мет-энкефалина. Отмечено значительное уменьшение этого пентапептида через 24 ч после двукратной (за 12 и 24 ч) дозирования интравентрикулярной инъекции циклогексемид в хвостатом ядре и фронтальных зонах коры больших полушарий. Вместе с тем в гипоталамусе за этот период не происходило столь существенного снижения уровня мет-энкефалина под действием блокатора трансляции. Можно полагать, что последнее могло быть связано со значительным содержанием высокомолекулярных предшественников энкефалина в этом отделе мозга, с одной стороны, или же с меньшей скоростью метаболизма пентапептида — с другой. В полосатом теле циклогексемид существенно не снижал количество мет- и лей-энкефалинов и через 24 ч их содержание составляло 82 и 84% соответственно от исходных значений.

Картина менялась при предварительном введении животным галоперидола. Данный препарат при введении крысам в дозе 2 мг/кг массы тела в течение 12 сут повышал на 60% уровень мет-энкефалина и в меньшей степени лей-энкефалина. Циклогексемид полностью блокировал указанный эффект. Иные результаты были продемонстрированы при определении уровня мет-энкефалина во фронтальной коре. Здесь циклогексемид после однократной внутрижелудочковой инъекции в дозе 500 мкг существенно не влиял на содержание пептида как в контроле, так и при введении галоперидола. Последний не повышал уровень мет-энкефалина и в отсутствие ингибитора трансляции. Объясняя неодинаковые эффекты галоперидола в различных отделах мозга, авторы предположили, что они могут быть обусловлены специфической блокадой нейролептиком дофаминергической передачи нервного импульса. Сделано допущение, что увеличение количества мет- и лей-энкефалинов обеспечивается транссинаптическими механизмами. Иначе говоря, в мозге должны существовать, если верно это

допущение, ферментные системы, увеличивающие скорость синтеза энкефалинов, которые активируются транссинаптически галоперидолом. Не исключено, что последний в данном случае может выступать как «заменитель» естественного регулятора, действующего подобным образом в физиологических условиях.

Общеизвестно, что любые молекулы, выполняющие роль регуляторов в организме, должны обладать по крайней мере двумя основными чертами — высокой скоростью синтеза или освобождения в активной форме и способностью к быстрой инактивации. В свете последнего положения рассмотрим данные о метаболической деградации молекул энкефалинов. Выше при разборе механизмов взаимодействия энкефалинов с опиатными рецепторами мы уже указывали на возможность их быстрой инактивации. В настоящем разделе мы разберем этот вопрос более детально.

Установлено, что метаболическая трансформация энкефалинов инициируется разрывом амидной связи тир-гли [Hambrock J. M. et al., 1976; Miller R. J. et al., 1977; Merk J. L. et al., 1977]. Указанный процесс происходит очень быстро как в присутствии плазмы крови человека и крысы, так и гомогенатов мозга. При этом специфическая активность мет- и лей-энкефалинов полностью исчезает.

Сходные закономерности выявляются и в экспериментах *in vivo* [Duport A. et al., 1977]. Уже через 15 с после внутривенной инъекции [^3H]-мет-энкефалина только около 5% общей радиоактивности плазмы крови и экстрактов головного мозга регистрируется в составе интактной молекулы пентапептида, а 74% общей радиоактивности ассоциировано со свободным тирозином. Согласно этим результатам, период полураспада мет-энкефалина в плазме крови составляет примерно 5 с. В последующем был проведен более подробный анализ локализации гидролаз, инактивирующих энкефалины [Lane A. C. et al., 1977]. Для этого осуществлено субклеточное фракционирование гомогенатов мозга (без продолговатого мозга и мозжечка) крыс и получены спинномозговая жидкость путем пункции большой цистерны. Результаты исследования показали, что основная активность ферментов, гидролизующих энкефалины, ассоциируется с растворимой субфракцией синапсом. Митохондриальная фракция мозга и интратерминальная

субфракция активно
ция и с
кую ак
предпо
тов, ин
ную свя

Обсу
кирующ
дует осо
стоятель
лизован
головног
держани
лось по
в различ
тивность

Влияние р
и плазме

Плазма
Растворима
Синапсом
Митохонд
Растворима
Синаптичес
Синапсом
Интратерми

¹ Цифр
² ЭДТА

Кроме
кефалина
тир-гли-г
внутривен
что, кром
ществова
тапептида
Сейчас
гетероген

субфракция митохондрий синапсом имеют подобную активность специфических пептидаз. Везикулярная фракция и синапсомальные мембраны содержат более низкую активность. На основании этих наблюдений можно предположить, что определенная локализация ферментов, инактивирующих энкефалины, указывает на непрочную связь их молекул с мембранами синапсом.

Обсуждая вопрос о распределении ферментов, блокирующих активность энкефалинов в организме, следует особо отметить еще одно чрезвычайно важное обстоятельство. Как оказалось, данные ферменты, локализованные в плазме крови и клеточных структурах головного мозга, весьма гетерогенны не только по содержанию, но и по своим свойствам. В частности, удалось показать, что некоторые химические соединения в различной степени и неоднозначно ингибируют активность энкефалиназ (табл. 4).

Таблица 4

Влияние различных реагентов на активность энкефалиназ в мозге и плазме крови¹

Фракция	Лейцил-нафтиламид	ЭДТА ²	п-хлормеркурий бензоат
Плазма	41	14	0
Растворимая фракция мозга	79	17	90
Синапсомальная фракция	92	1	90
Митохондриальная фракция	62	15	93
Растворимая фракция синапсом	82	0	19
Синаптические пузырьки	100	100	42
Синапсомальные мембраны	71	0	47
Интраклеточные митохондрии	78	16	92

¹ Цифрами указан % ингибиции активности фермента.

² ЭДТА доводили до pH 7,4 раствором NaOH.

Кроме того, при анализе продуктов распада мет-энкефалина в мозговой ткани были найдены фрагменты тир-гли-гли-фен и тир-гли-гли через 15 с и 2 мин после внутривенной инъекции мет-энкефалина. Сделан вывод, что, кроме разрыва амидной связи тир-гли, могут существовать и другие пути инактивации указанного пептида в головном мозге.

Сейчас трудно дать однозначную трактовку факту гетерогенности ферментных систем, обеспечивающих

инактивацию энкефалинов. Предположительно в данном случае можно думать или о наличии конкурентных ингибиторов в определенных отделах или фракциях мозговой ткани или о том, что часть ферментов, принимаемая за энкефалиназы, действует на самом деле не специфически и в нормальных условиях предназначена для другой цели, не связанной непосредственно с инактивацией энкефалинов.

Дополнительная информация об активности ферментов, инактивирующих энкефалины, была получена на модельной системе с использованием интактных клеток нейробластомы [Nazim E. et al., 1979]. Последние, как известно, содержат опиатные рецепторы и успешно используются для анализа тонких механизмов взаимодействия экзогенных и эндогенных лигандов. Найдено, что эти клетки имеют в своем составе ферментные системы, разрушающие энкефалины и, следовательно, в качестве модели могут с успехом использоваться для изучения функции последних.

Показано, что скорость разрушения энкефалинов линейно возрастает при увеличении числа клеток нейробластомы в системе. Она укладывается в классическую схему Михаэлиса — Ментен ($K_m = 5 \times 10^{-5}$) и зависит от температуры. При 37°C 90% пентапептидов разрушается в течение 30 мин, уменьшение же температуры инкубационного раствора снижает скорость инактивации. Замедление деградации пептида с сохранением его специфической активности может быть обеспечено добавлением к клеточной культуре пуромидина, бацитрацина и Mn^{2+} . Дополнительные исследования продемонстрировали, что энкефалиназы локализуются на поверхности плазматических мембран клеток. Лизосомальный ингибитор хлороквин, а также соединения, нарушающие функцию микрофиламентов, такие, как колхицин, цитохлазин В и винбластин, являясь внутриклеточными ядами, не влияют на активность энкефалиназ. В то же время, если клетки нейробластомы подвергали действию трипсина и затем соевого трипсинового ингибитора, происходила блокада активности энкефалиназ. Сам же ингибитор трипсина не обладает подобным эффектом.

Изучена также возможная корреляция между степенью занятости опиатных рецепторов и активностью ферментов, разрушающих активную молекулу энкефалина. Для этого клеточные культуры предварительно

инкубировали с агонистами и антагонистами опиатов. Результаты этой работы показали, что такая корреляция отсутствует.

Весьма важно на наш взгляд, что энкефалиназная активность обнаруживалась также в клеточных популяциях, не содержащих опиатные рецепторы и не являющихся клетками-мишенями для опиатов. Подобная активность найдена, в частности, в культуре человеческих фибробластов, L-клетках мышей и ЗТЗ-фибробластах. Эти данные согласуются с нашим предположением, что в ряде случаев «энкефалиназная активность» может носить неспецифический характер. Другой вопрос, насколько эта неспецифичность неспецифична. Действительно, в связи с вышесказанными наблюдениями возникает проблема, решение которой имеет принципиальное значение. Суть этой проблемы заключается в решении вопроса, не является ли переменная эффективность гидролаз энкефалинов строго упорядоченной системной функциональной организацией, обеспечивающей последовательную модуляцию проведения нервного импульса в различных синапсах. Кроме того, необходимо выяснить, насколько широко такие дифференцированные эффекты используются в нервной системе и в чем их конкретное биологическое значение. К сожалению, сама рассматриваемая нами область знаний настолько молода, что исчерпывающих ответов на эти вопросы дать не представляется возможным. В то же время основания для подобной постановки задач, требующих пристального внимания и активного анализа, по нашему мнению, уже имеются.

В этом свете нам представляются привлекательными исследования В. Malfroy и соавт. (1978), которые изучали активность энкефалиназ в растворимой и осажденной фракциях мозга мышей из области полосатого тела. Как известно, именно в этом отделе головного мозга имеются большое количество опиатных рецепторов и высокое содержание энкефалинов.

Установлено, что в осаждаемой фракции содержится два вида пептидаз, одна из которых совпадает по своим свойствам с ферментом растворимой фракции, другая же значительно отличается от первых двух. На основании анализа кривых зависимости гидролиза [^3H]-лей-энкефалина от концентрации немеченого аналога показано наличие высокоспецифической пептидаз-

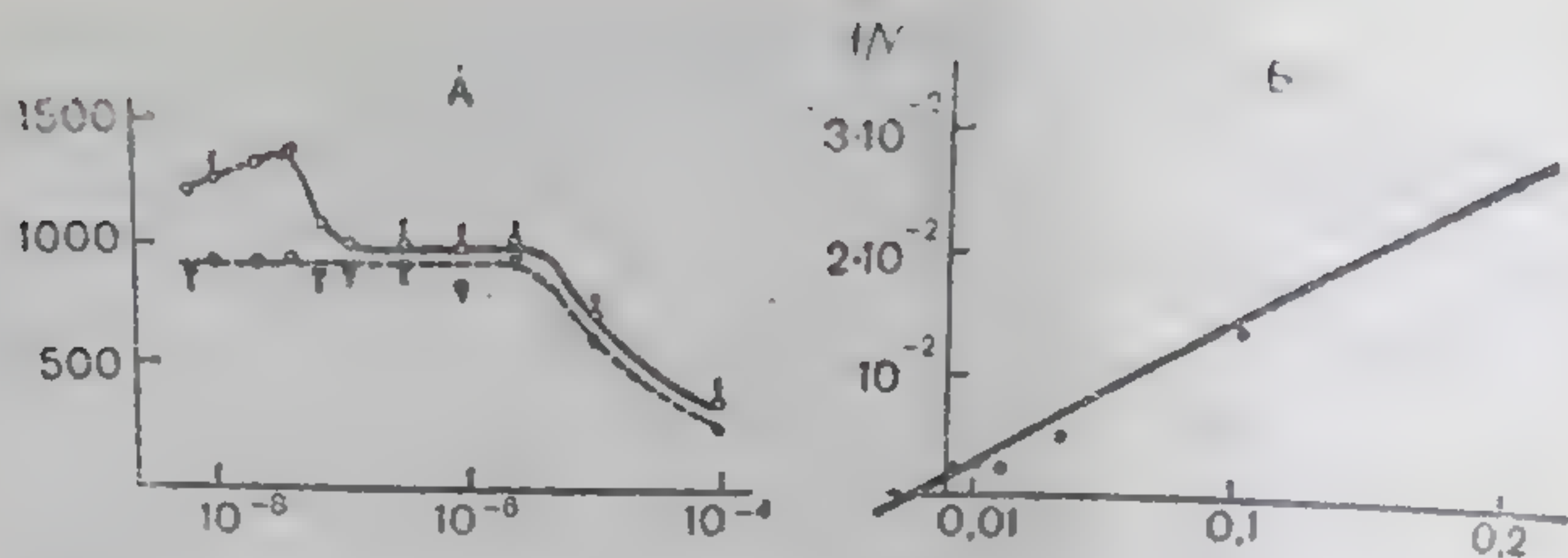


Рис. 14. Высоко- и низкоспецифические пептидазы лей-энкефалина. А — влияние увеличивающихся концентраций лей-энкефалина на гидролиз $[^3\text{H}]$ -лей-энкефалина фракцией полосатого тела мозга мышей, содержащей высокоспецифическую пептидазу (сплошная линия), и фракцией, содержащей только низкоспецифическую пептидазу (штриховая линия); на оси абсцисс — [лей-энкефалин] (М); на оси ординат — продукты гидролиза $[^3\text{H}]$ -лей-энкефалина (распады в мин.); Б — зависимость скорости гидролиза высокоспецифической пептидазы от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Бэрка; на оси абсцисс — $1/[\text{лей-энкефалин}]$ (нМ).

ной активности, так как кривая имеет двухфазный характер (рис. 14). На ее основе построен график зависимости обратной концентрации немеченого лей-энкефалина от обратной скорости гидролиза. Из полученной прямой определена K_m , равная 90 нМ, тогда как для низкоактивной пептидазы K_m составляет 10—100 мкМ. Высокоспецифическая пептидаза, как следует из приведенных данных, обладает очень высоким аффинитетом к энкефалинам и действует при их концентрации в среде порядка 10^{-8} — 10^{-7} М.

Структурные требования для связи энкефалинов с опиатным рецептором и высокоспецифической пептидазой значительно различаются, так как опиаты и эндорфины не ингибируют активность этой пептидазы. Определение для различных веществ концентрации, при которой активность пептидазы уменьшается на 50%, позволило установить, что наибольшим структурным сходством к этому ферменту обладают лей-энкефалин и L-Ала²-производные мет-энкефалина. Ингибиторная способность нативного мет-энкефалина в 5 раз менее выражена, чем у лейцинового аналога. Для ингибции активности пептидазы большое значение имеет целостность молекулы пентапептида. Резкое уменьшение активности наблюдается у всех С-концевых фрагментов энкефалина, в то же время изъятие тирозина из молекулы мет- и лей-энкефалинов в некоторой степени сохраняет ингибирующую способность молекул по отношению к высокоспецифической пептидазе.

Каче
дазы от
также в
гли-фен
фрагмен
ключени
факт, что
зарегист
что общ
ставляет
тами мо
вателей,
Вместе
ront и
тир-гли-
мозга на
ществова
О фи
специфич
изученны
ческое ви
ным в ви
ному по
Пептидаз
ловиях н
Михаэлис
рованное
цифическ
симально
изменени
прямое у
кул. Ана
тидаз в р
их концен
ности: по
лушарий
ное распр
личествен
ров в эти
высказыва
ские пепт
щим факт
ведения н
делах нер

Качественное отличие высокоспецифической пептидазы от ранее рассмотренных энкефалиназ заключается также в том, что этот фермент расщепляет в энкефалине гли-фен связь с выделением тир-гли-гли неактивного фрагмента. Классические ингибиторы пептидаз за исключением бацитрацина не влияют на этот фермент. Тот факт, что высокоспецифическая пептидаза не была ранее зарегистрирована, по мнению авторов, объясняется тем, что общая концентрация характерных метаболитов составляет только 2—3% при работе с целыми гомогенатами мозга, использовавшимися большинством исследователей, и около 25% в тщательно отмытых осадках. Вместе с тем здесь уместно вспомнить работу А. Dupont и соавт. (1977), которые наблюдали появление тир-гли-гли фрагментов при анализе действия пептидаз мозга на мет-энкефалин и допускали возможность существования пептидаз с различным типом действия.

О физиологической значимости найденных высокоспецифических пептидаз, радикально отличающихся от изученных ранее, свидетельствует тот факт, что хроническое введение морфина или имплантация его животным в виде таблетки приводит к быстрому и значительному повышению активности именно этого фермента. Пептидазы же, разрушающие тир-гли связь, в этих условиях не изменяются. Изучение кинетических констант Михаэлиса — Ментен продемонстрировало, что индуцированное морфином повышение активности высокоспецифических пептидаз сопровождается увеличением максимальной скорости реакции (V_{\max}) без значительного изменения K_m . Это можно однозначно трактовать как прямое указание на увеличение числа ферментных молекул. Анализ распределения высокоспецифических пептидаз в различных отделах мозга мышей показал, что их концентрация убывает в следующей последовательности: полосатое тело > гипоталамус > кора больших полушарий > ствол мозга > гиппокамп > мозжечок. Подобное распределение в высокой степени коррелирует с количественным соотношением числа опиатных рецепторов в этих отделах головного мозга. На этом основании высказывается мнение, что именно высокоспецифические пептидазы являются определяющим лимитирующим фактором в энкефалинергической регуляции проведения нервных импульсов в специализированных отделах нервной системы.

Исходя из аналогии с антихолинэстеразой, В. Mal-
froy и соавт. (1978) полагают, что обнаружение этого
фермента может служить основой для разработки ново-
го класса фармакологических препаратов (ингибито-
ров энкефалиназ), которые могут проявлять в биологи-
ческом плане действие, подобное морфину. Кроме того,
не исключается, что подобные препараты могут быть ис-
пользованы для терапии расстройств, связанных с раз-
витием физической зависимости от опиатов.

Как мы отмечали ранее, интегральный анализ меха-
низма действия и физиологического значения эндоген-
ных морфиноподобных соединений невозможен без оцен-
ки эффективности всех веществ, составляющих такую
систему регуляторов. В этой связи необходимо рассмот-
реть данные, касающиеся как энкефалинов, так и эн-
дорфинов. При разборе физико-химических свойств по-
следних мы уже отмечали наличие тесной связи эндор-
финов с гипофизом. Локализация эндорфинов во мно-
гом совпадает с распределением опиатных рецепторов.
В частности, в гипофизе наибольшая концентрация эн-
дорфинов определяется в передней и средней долях
железы, хотя некоторые количества этого пептида об-
наруживаются и в задней доле [Salih H. et al., 1979].
Подробно распределение эндорфинов и их связь с эн-
кефалинами изучены с использованием радиоиммуно-
логических методов [Rossier J. et al., 1977]. Предпосыл-
кой для проведения указанных исследований явилось
получение высокоспецифических антисывороток. Мы при-
водим некоторые характеристики последних, так как они
весьма существенны для интерпретации накопленных
с их помощью данных. Антисыворотка к лей-энкефалину
обладает способностью к перекрестному реагированию
с мет-энкефалином, однако молярное соотношение по-
следнего в 30 раз превышало таковое для лей-аналога.
Таким образом, перекрестная реактогенность мет-энке-
фалина составляет 3,3%. В связи с тем что разные от-
делы мозга содержат лей- и мет-энкефалины в неоди-
наковых соотношениях или только один из двух пента-
пептидов, предложено выражать концентрацию энкефа-
линов в мозге в виде единиц. Одна единица энкефалина
(ЕД — ЭК) соответствует 1 нг лей-энкефалина (соот-
ветственно 1 мЕД составляет 1 пг этого пептида) и 30 нг
мет-энкефалина. Зная количественное соотношение мет-
и лей-энкефалина в конкретном отделе мозга, легко дать

количеств
отметить,
перекрест
очередь а
другие св
та молеку
крестные
эндорфин
кулярной
молекул
гель-филь
присутстви
сывороток
ные, каса
ЦНС.

Как и
фина пайд
Там же от
линов. Пос
ных систем
че выгляд
гипофизе.
железы, по
зования э
чайно мал
поталамус
с мостом
тельное к
строгое, но
отделах Ц
тое тело,
жечок, энд

Интерес
делении со
отделах пр
фина и эн
ких предел
сальной и
соответстве
и хвостато
большое к
отсутствов
Следова
ют, что в

количественную оценку наблюдаемых реакций. Следует отметить, что антисыворотки к энкефалинам не дают перекрестных реакций с α - и β -эндорфинами. В свою очередь антисыворотка к эндорфинам имеет несколько другие свойства. Она специфична для лей¹⁴-гис²⁷ сегмента молекулы этого пептида и дает в этой связи перекрестные реакции в эквимольном соотношении как с эндорфином, так и с β -ЛТГ и его прогормоном с молекулярной массой 31 000. Выраженные различия этих молекул позволяют достаточно просто разделить их гель-фильтрацией и выявить активность, обусловленную присутствием эндорфинов. Применение подобных антисывороток позволило получить весьма интересные данные, касающиеся локализации пептидов-аналгетиков в ЦНС.

Как и предполагалось, высокое содержание β -эндорфина найдено в гипофизе, особенно в передней доле. Там же отмечена и максимальная концентрация энкефалинов. Последнее обусловлено существованием ферментных систем, расщепляющих молекулы эндорфинов. Иначе выглядит соотношение опиоидных пептидов в адено-гипофизе. Эндорфины, представленные в этой части железы, по-видимому, не являются субстратом для образования энкефалинов, уровень которых здесь чрезвычайно мал. Такие анатомические образования, как гипоталамус, перегородка, средний и продолговатый мозг с мостом мозга (варолиевым мостом), содержат значительное количество β -эндорфина, которое, хотя и не строго, но коррелирует с уровнем энкефалинов в этих отделах ЦНС. В других же отделах, таких, как полосатое тело, гиппокамп, кора больших полушарий и мозжечок, эндорфины совсем не содержатся.

Интересные данные были также получены при определении содержания опиоидных пептидов в различных отделах промежуточного мозга. Соотношение β -эндорфина и энкефалинов в этом случае колебалось в широких пределах, и в таламусе оно составляло 9,1, в дорсальной и вентральной преоптических зонах 5,2 и 3,8 соответственно, а в гипоталамусе — 1,7. В бледном шаре и хвостом ядре иммуногистохимически определялось большое количество энкефалинсодержащих волокон и отсутствовал β -эндорфин.

Следовательно, приведенные данные свидетельствуют, что в ЦНС области, осуществляющие в физиологи-

ческих условиях регуляцию передачи нервного импульса посредством опиатных рецепторов, неоднородны по физико-химическим свойствам эндогенных лигандов (самых или их предшественников). Биологическая значимость подобной дифференцировки сама по себе не вызывает сомнения. Другой вопрос: в чем эта значимость конкретно проявляется в условиях нормальной жизнедеятельности и особенно при патологических состояниях. Важный вывод, который можно сделать уже сейчас, состоит в том, что любое незначительное нарушение метаболических путей эндорфинов или энкефалинов как генетически детерминированного, врожденного или приобретенного характера может затрагивать не всю систему модуляции межнейрональной передачи в пределах деятельности опиатных рецепторов. Подобные нарушения могут вызывать дисфункциональные расстройства отдельных, иногда четко ограниченных участков ЦНС, определяя в каждом случае свою специфическую симптоматику. Как следствие этого вывода можно сделать заключение о реальной возможности фармакологического воздействия не на всю систему, в целом, а, исходя из особенностей метаболизма, на отдельные ее участки, или, иначе говоря, области мозга.

Оценивая возможность использования в медицинской практике эндогенных опиоидных лигандов, следует также учитывать, что многие опиатные рецепторы способны в большей или меньшей степени перекрестно реагировать со многими из них. Вместе с тем ферментные системы инактивации каждого конкретного лиганда обладают большей специфичностью, что создает условия для более длительного взаимодействия и накопления введенных извне препаратов, созданных на основе эндогенных соединений, не в местах их физиологического действия, а далеко за его пределами. Последнее необходимо учитывать и при фармакологическом тестировании опиоидных пептидов на лабораторных животных, особенно при регистрации изменения функции физиологических систем и поведенческих реакций.

В настоящее время имеются данные и о ферментных системах, участвующих в образовании эндорфинов и их метаболической трансформации [Austen B. M. et al., 1977; Graf L. et al., 1977, и др.]. Установлено, что в передней и средней доле гипофиза, а именно в секреторных гранулах, содержится фермент, не присутст-

вующий в
рушает а
нием мол
своим сво
плазмине
трацину,
зы, разру
Кроме то
битором
ем такого
ной желе

Несмо
локализат
кулу акти
роятным
вание и
очередь с
городка,
дит образ
молекул-г
дальнейш
низкомол

Послед
ten B. M.
вали с от
ной из мо
условиях
некоторог
должител
наблюден
более чув
зам, чем
ферментн
центами
всей веро
бация же
сопровожд
Подобный
этой обла
следовате
способств

Анало
проса о
представл

вующий в других отделах мозга. Он специфически разрушает arg^{60} - tir^{61} пептидную связь β -ЛТГ с образованием молекулы β -эндорфина. Найденный фермент по своим свойствам значительно отличается от трипсина и плазмина. Он характеризуется устойчивостью к бацитрацину, который, как известно, инактивирует пептидазы, разрушающие молекулы эндорфина и энкефалинов. Кроме того, этот фермент не блокируется соевым ингибитором трипсина, однако инактивируется под действием такого же ингибитора, выделенного из поджелудочной железы.

Несмотря на заключение о специфической органной локализации фермента, вычлещающего из β -ЛТГ молекулу активного β -эндорфина, представляется весьма вероятным при более тщательном анализе его существование и в определенных отделах мозга. Это в первую очередь относится к тем областям (гипоталамус, перегородка, средний и продолговатый мозг), где происходит образование молекул β -эндорфина из более крупных молекул-предшественников. Затем может происходить дальнейший распад β -эндорфина с образованием более низкомолекулярных соединений.

Последнее подтверждается экспериментами [Austin B. M. et al., 1977], в которых β -эндорфин инкубировали с отмытой синаптосомальной фракцией, выделенной из мозга крыс. В присутствии бацитрацина в этих условиях зарегистрировано образование γ -эндорфина и некоторого количества мет-энкефалина. При более продолжительной инкубации появляется и α -эндорфин. Это наблюдение заставляет предположить, что γ -эндорфин более чувствителен к аминопептидазам и карбопептидазам, чем β -эндорфин. Показано далее, что найденные ферментные системы не являются составными компонентами комплекса пептид — опиатный рецептор, и, по всей вероятности, функционируют внеклеточно. Инкубация же β -эндорфина со срезами полосатого тела не сопровождается гидролизом молекулы этого пептида. Подобный эффект закономерен, если вспомнить, что в этой области мозга в норме β -эндорфин отсутствует, а, следовательно, и не локализованы ферментные системы, способствующие его инактивации.

Аналоги опиоидных пептидов. После обсуждения вопроса о метаболизме эндорфинов и энкефалинов нам представляется важным рассмотреть некоторые меди-

цинские аспекты указанной проблемы. Говоря об естественных эндогенных лигандах, следует подчеркнуть, что при парентеральном введении энкефалины практически моментально разрушаются и специфический эффект — аналгезию в этих условиях получить не удастся. Эндорфины несколько более резистентны к действию пептидаз и эффективны как аналгетики при внутривенном введении.

Открытие ферментных систем, инактивирующих опиоидные пептиды, ознаменовалось целой серией работ, направленных на изучение синтетических производных энкефалинов, защищенных тем или иным образом от инактивации специфическими пептидазами. Первоначальные надежды, связанные с этими исследованиями, на создание идеального аналгетика, лишённого отрицательных свойств традиционных наркотиков, во многом не оправдались. Вместе с тем появились новые основания для продолжения подобных исследований. Рассмотрим основные физико-химические свойства аналогов опиоидных пептидов в связи с особенностями их биодеградаций и взаимодействия с опиатными рецепторами.

При синтезе аналогов и дериватов энкефалинов исследователи руководствуются найденными закономерностями, определяющими связь с рецептором естественных пентапептидов и их инактивацию специфическими пептидазами в организме. Основные из этих закономерностей можно суммировать следующим образом: 1) для взаимодействия пептида с рецептором существенно наличие NH_2 -группы тирозина; 2) строго фиксированное расстояние между молекулами тирозина и фенилаланина, определяющее конформацию молекулы энкефалинов; 3) наличие в С-терминальном конце молекулы метионина или лейцина, обеспечивающих гидрофобное взаимодействие; 4) присутствие в организме специфических пептидаз, разрушающих энкефалины с потерей биологической активности, которые действуют на тир¹-гли² и гли³-фен⁴-амидные связи.

Весьма перспективными оказались аналоги энкефалинов, в молекуле которых гли² заменен на молекулу D-аланина. Такое соединение обладает высоким аффинитетом к опиатному рецептору, по-видимому, или за счет большей комплементарности молекулы лиганда, или в результате создания дополнительного места свя-

зывания. К
честве ана
следнее, ка
шего сродс
тидазе, раз
ственного
Pert C. B.

Указани
ции в опре
кефалинам
молекулы п
замедлен п
ном. В то
аналог пра
ный пентап
носителем
инактиваци
более выр
такие же
[D-ала², ме
Lewis R. A.
кие аналге
гом по сра
объяснить
Обнаружен
ность не м
финитетом
амида к о
мозге мож
время мех
пептидов,

В то ж
по создани
именно на
инактиваци
ны произво
торых нар
тир¹-гли²-п
ны и С-ко
ния облад
свойствами
L-аминокис
2^{1/2} раза
введении,

зывания. Кроме того, D-ала²-аналоги эффективны в качестве анальгетиков и при внутривенном введении. Последнее, как полагают, происходит в результате меньшего сродства молекулы аналога к специфической пептидазе, разрушающей тир¹-гли² пептидную связь естественного лиганда [Hambrook J. M. et al., 1976; Pert C. B. et al., 1976].

Указанные особенности ферментативной инактивации в определенной степени характерны и для мет-энкефалинамида [Puig M. M. et al., 1977]. Протеолиз этой молекулы пептидазами подвздошной кишки значительно замедлен по сравнению с естественным мет-энкефалином. В то же время пептидазы мозга инактивируют этот аналог практически с той же скоростью, что и эндогенный пентапептид. Возникли естественные сомнения относительно доминирующей роли уменьшения скорости инактивации амидного производного в обеспечении его более выраженных анальгетических эффектов. Позже такие же сомнения были выдвинуты и в отношении [D-ала², мет⁵]-энкефалинамида [Von Voigtlander P. F., Lewis R. A., 1978]. Согласно полученным данным, высокие анальгетические свойства, проявляемые этим аналогом по сравнению с мет-энкефалином, нельзя всецело объяснить различиями в ферментативной инактивации. Обнаруженная более высокая анальгетическая активность не может быть обусловлена и неодинаковым аффинитетом мет-энкефалина и [D-ала², мет⁵]-энкефалинамида к опиатному рецептору. Авторы полагают, что в мозге может присутствовать неизвестный в настоящее время механизм неферментной инактивации опиоидных пептидов, для которого аналог не является мишенью.

В то же время основное внимание в исследованиях по созданию аналогов пептидов анальгетиков направлено именно на защиту молекул энкефалинов от ферментной инактивации. Для этого, в частности, были синтезированы производные лей- и мет-энкефалинов, в молекуле которых наряду с D-ала²-замещением, экранирующим тир¹-гли²-пептидную связь, на D-изомеры были замещены и C-концевые аминокислоты. Полученные соединения обладали более выраженными анальгетическими свойствами, чем пептиды, имеющие в 5-м положении L-аминокислоты. Синтезированные аналоги были в 2¹/₂ раза активнее морфина при внутрижелудочковом введении, но менее активны, чем последний при внутри-

венной инъекции. У обезьян [D-ала², D-лей⁵]-энкефалинамид при внутривенном введении вызывал аналгезию через 45 мин и этот эффект сохранялся в течение 3—4 ч. Налоксон блокировал указанное действие аналога. [D-ала², D-мет⁵]-энкефалинамид также, но в меньшей степени, обладал антиноцицептивным эффектом в отличие от [L-мет⁵ NH₂]-аналога, который был неактивен в этом отношении.

Анализ активности аналогов пентапептидов, проведенный в других лабораториях, показал отсутствие строгой корреляции между выраженностью эффектов *in vitro* (при определении специфического рецепторного связывания на препаратах продольной мышцы подвздошной кишки морской свинки или *vas deferens* мышей) и *in vivo* при регистрации анальгетической активности [Dutta A. S. et al., 1977; Coy D. H. et al., 1978]. Такие производные энкефалинов, как, например, лиз-тир-D-ала-гли-фен-мет-Оме; лиз-тир-D-сер-гли-фен-мет-Оме; тир-D-ала-гли-фен-лей-NH(CH₂)₂NMe₂; тир-D-ала-гли-фен-лей-O-(CH₂)₂-ОН имеют высокий аффинитет к опиатным рецепторам подвздошной кишки, но малоактивны как анальгетики при внутривенном введении мышам. Напротив, [D-ала², F-фен⁴]-энкефалинамид и N^α, N^ε-бис (D-ала²-энкефалин)-лиз-амид значительно слабее взаимодействовали с *vas deferens* мышей, но проявляли высокую анальгетическую активность как по силе, так и по продолжительности действия при внутрижелудочковом введении крысам.

Вполне возможно, что описанные выше отличия в эффектах различных аналогов энкефалинов или одного производного при разных способах введения обусловлены особенностями их метаболической инактивации. Однако и в данных случаях есть основания полагать, что различия в ферментативной инактивации являются важным, но не основным фактором, обеспечивающим неоднородность эффектов. Действительно, существуют экспериментальные доказательства, что как D⁵, так и L⁵-изомеры в одинаковой степени метаболизируются при инкубации с плазмой крови при 35°C или с плазматическими мембранами мозга. Более того, D⁵-изомеры энкефалинов обладают более низким аффинитетом (по вытеснению [³H]-наллоксона) к опиатным рецепторам, чем [D-ала², L-мет⁵]-энкефалинамид. Для объяснения найденных противоречий можно предположить,

что D⁵- и L-изомеры энкефалинов имеют неодинаковую способность преодолевать гематоэнцефалический барьер.

Более подробные исследования показывают, что для инактивации энкефалинов могут быть использованы различные препараты. Например, инактивация энкефалинов может не отличаться от инактивации других пептидов. В-вторых, энкефалины могут взаимодействовать с рецепторами мозга, дающие более высокие эффекты, чем энкефалины.

В пользу этого свидетельствуют данные А. З. Рубина, которые показывают, что действие агонистов энкефалинов опосредовано рецепторами подвздошной кишки и *vas deferens* мышей. Под влиянием рецепторов энкефалинов, кроме того, происходит инактивация энкефалинов и набухание кишечника. Однако, несмотря на то, что энкефалины обладают анальгетическим действием, набухание кишечника не является следствием действия энкефалинов.

Возможны также другие механизмы инактивации энкефалинов, как, например, инактивация энкефалинов на (сокращение) мышечной ткани, обладающей высокой активностью мозга (Клиническое исследование энкефалинов, освещающее

что D⁵- и L⁵-аналоги [D-ала²]-мет-энкефалина могут в неодинаковой степени проходить через гематоэнцефалический барьер.

Более правдоподобными, на наш взгляд, все же являются другие объяснения. Во-первых, ферментативная инактивация пептидных молекул при инкубации с мембранными препаратами, выделенными из целого мозга, может не отражать реальные закономерности, присущие отдельным, пусть и очень ограниченным в общем объеме участкам мозговой ткани. Иначе говоря, участки мозга, корреспондирующие анальгезирующий эффект аналогов энкефалинов, могут иметь существенные отличия ферментных систем, гидролизующих пептидные молекулы. Во-вторых, что еще более вероятно, среди опиатных рецепторов мозга могут присутствовать популяции, обладающие более выраженным аффинитетом к D⁵-аналогам энкефалинов.

В пользу этих предположений свидетельствуют данные А. Z. Ronai и соавт. (1977), которые выявили значительные различия в кинетических параметрах взаимодействия агонистов и антагонистов, в том числе группы аналогов опиоидных пептидов с опиатными рецепторами подвздошной кишки морской свинки и *vas deferens* мышей. Подробные сведения о гетерогенности опиатных рецепторов приведены нами в предыдущей главе. Кроме того, показано, что введение [D-ала²]-мет-энкефалинамида и морфина в вентролатеральные участки ретикулярной формации мозга крыс вызывает развитие анальгезии и характерные поведенческие эффекты. Налоксон во всех случаях блокирует анальгетический эффект, однако не влияет на поведенческие реакции, индуцированные морфином. Последнее заставляет думать о наличии в ретикулярной формации среднего мозга нескольких популяций опиатных рецепторов, взаимодействие с которыми и определяет отличия эффектов при действии налоксона.

Возможностью взаимодействия с несколькими популяциями или субфракциями опиатного рецептора обусловлена высокая активность такого аналога энкефалинов, как D-ала²-, N-ме-фен⁴, мет-(O)⁵-ол-энкефалина (сокращенное название ГК 33—824). Это соединение обладает высоким аффинитетом к опиатным рецепторам мозга ($K_{дисс.} = 0,42$ нМ) и медленнее, чем другие энкефалины, освобождается из связанных с мембранами ре-

цепторов — период полураспада комплекса рецептор — лиганд при 4 °С составляет более 25 мин. Экспериментами по конкурентному связыванию продемонстрировано, что ¹²⁵I-ГК 33—824 одинаково хорошо связывается μ - и δ -типами опиатного рецептора.

Именно при работе с указанным аналогом энкефалинов было получено первое прямое доказательство на молекулярном уровне гетерогенности рецепторных белков [Kream R. M., Zukin R. S., 1979]. Установлено, что при электрофорезе комплекса ¹²⁵I FK 33—824 с опиатным рецептором в полиакриламидном геле радиоактивность ассоциирована с белками массой 27 000, 35 000 и 42 000. Между тем электрофорез рецепторного комплекса другого производного энкефалинов — ¹²⁵I-D-ала²-лей⁵-лиз⁶-энкефалина, который является «чистым» агонистом δ -рецепторов, выявил лишь один меченый пик с молекулярной массой 35 000.

Сделав эти общие замечания о возможных механизмах, отражающих эффективность молекул, рассмотрим еще некоторые структурно-активные особенности, определяющие специфические свойства аналогов энкефалинов. Согласно исследованиям S. Bajusz и соавт. (1976), выраженными агонистическими свойствами обладают синтетические производные мет-энкефалина (активность естественного пептида принята за 1 при тестировании на препаратах подвздошной кишки морских свинок), имеющие в молекуле следующие замещения.

I. тир-гли-гли-фен-нлей-ОН	0,5
II. тир-гли-гли-фен-нлей-ОМе	0,9
III. тир-D-фен-гли-фен-нлей-ОН	0,2
IV. тир-гли-D-ала-фен-нлей-ОН	< 0,05
V. тир-D-ала-D-ала-фен-нлей-ОН	0,05
VI. тир-D-ала-гли-фен-нлей-ОН	3,0
VII. тир-D-мет-гли-фен-нлей-ОМе	5,0
VIII. тир-D-мет-гли-фен-нлей-ОН	3,5
IX. тир-D-ала-гли-фен-нлей-ОН	1,8
X. тир-D-ала-гли-фен-про-ОН	0,4
XI. тир-D-ала-гли-фен-про-NH-Эт	0,8
XII. тир-D-ала-гли-фен-про-NH-Амил	1,5
XIII. тир-D-мет-гли-фен-про-ОН	3,0
XIV. тир-D-мет-гли-фен-про-NH-Эт	5,5
XV. тир-D-нлей-гли-фен-про-NH-Эт	11,7

Арабскими цифрами указана активность синтетических аналогов по сравнению с мет-энкефалином. Заме-

щение мет⁵-аминокислоты на норлейцин, изолейцин и пролин было продиктовано тем обстоятельством, что последние могут осуществлять сильное гидрофобное взаимодействие, определяющее биохимическое значение С-концевой аминокислоты естественных энкефалинов. Не исключено также, что замена С-концевого метионина может способствовать экранированию гли³-фен⁴-амидной связи от воздействия эндопептидаз. Показательно, что замена 2-го и (или) 3-го остатка глицина на D-аланин ведет к резкому снижению аффинитета этой молекулы к опиатным рецепторам, по-видимому, в результате резкого изменения конформации. То же самое происходит и при замене гли² на ароматическую D-аминокислоту. [D-ала²]-производные с С-концевым изолейцином или пролином имели меньшую активность, чем соединения, содержащие норлейцин. Высокий аффинитет к опиатному рецептору имели молекулы, где гли² был замещен молекулой D-метионина или D-норлейцина с нлей на С-терминальном конце пентапептида.

Интересные закономерности были выявлены при интравентрикулярном и внутривенном введении полученных аналогов крысам. Оказалось, что все соединения с X по XV обладали анальгетическим эффектом *in vivo*; предыдущие же синтетические производные с I по IX были малоактивны при внутрижелудочковом введении и не активны при внутривенных инъекциях. В этой связи можно полагать, что наличие пролина в конце молекулы препятствует специфической инактивации синтетических аналогов в организме. Однако следует отметить, что значительные отличия в активности аналогов в условиях *in vivo* и *in vitro* были найдены и в первой группе соединений. Так, [D-ала², про⁵]-энкефалинэтиламид (XI) обладал меньшей активностью *in vitro* по сравнению с [D-ала², про⁵]-энкефалиналкиламидом (XII). В то же время *in vivo* этиламидное производное было во много раз активнее последнего. Похожие закономерности найдены и в отношении XIV—XV аналогов. В экспериментах *in vitro* [D-нлей²]-производное было значительно активнее [D-мет²]-аналога. При внутрижелудочковом же введении [D-мет², про⁵]-энкефалинэтиламид вызывал более сильный анальгетический эффект, а в условиях внутривенных инъекций активность того и другого аналога была приблизительно одинаковой.

Следовательно, можно полагать, что подобные различия в эффектах в данном конкретном случае не связаны с изменением аффинитета аналогов к опиатным рецепторам, а в основном определяются особенностями ферментной деградации их молекул. Такое заключение не является неожиданным, так как выше мы подчеркивали наличие выраженных регионарных отличий активности ферментных систем, инактивирующих опиоидные пептиды. Естественно, что для других синтетических производных энкефалинов указанное условие по ряду параметров может не сохраняться.

Так, в настоящее время получены соединения, резистентные к действию пептидаз ткани мозга — $[N^{\alpha}(\text{CH}_3\text{-тир})^1, (\text{дез-СООН-илей})^5]\text{-энкефалин}$ и $[(\text{D-ала})^2, (\text{дез-СООН-Илей})^5]\text{-энкефалин}$ [Day A. R. et al., 1978]. Установлено, что оба соединения не теряют биологических свойств при инкубации с гомогенатами целого мозга при 37 °С в течение 90 мин. Они также были более активны, чем естественный мет-энкефалин, в отношении препаратов подвздошной кишки морской свинки и в отличие от последнего проявляли высокую анальгетическую способность, регистрируемую по тесту «удара хвоста», при внутрижелудочковом введении мышам или через постоянный катетер в серое вещество периакведукта крыс. Указанные эффекты блокировались налоксоном.

Аналоги энкефалинов при замещениях в N- и C-терминальных концах молекулы, защищенные от действия пептидаз и как следствие этого активные при внутривенном введении, были получены и в лаборатории С. Н. Ли [Yamashiro D. et al., 1977]. Так, два модифицированных пептида $[\text{D-тре}^2\text{-тиаз}^5]\text{-}$ и $[\text{D-мет}^2, \text{тиаз}^5]\text{-энкефалинами}$ (тиаз — тиазолидин-4-карбоксилловая кислота) проявляли дозозависимые свойства высокоактивных анальгетиков при внутривенном и внутрижелудочковом введении мышам по тесту «удара хвоста». Они имитировали эффекты морфина также по тесту Штрауба и локомоторной активности. Первое соединение было в $3\frac{1}{2}$ раза более активно, чем второе, и в молярном отношении $[\text{D-тре}^2, \text{тиаз}^5]\text{-энкефалинамид}$ — в 27,1 раза, а $[\text{D-мет}^2, \text{тиаз}^5]\text{-энкефалинамид}$ в 7,7 раза превосходил морфин при внутрижелудочковой инъекции и напоминали β -эндорфин при внутривенном применении. Таким образом, вышеприведенные примеры со всей очевидностью сви-

детельств
туры мол
важной с
гетически

Не об
менения
обходимы
синтетиче
ду наличи
у некотор
кефалина
цина, бло
молярные
связывани
различаю
мет-энкеф
таковой м
инкубаци
наиболее
нако мет
в 3 раза
звояет х
лее чисты
идным пе
et al., 197

В то
на сущес
линов и с
жет служ
концентра
тором пр
Это соеди
ствием пр
абстинен
ной физи
ные данн
ности соз
щих свой
положить
специфиче
с больши
агонистов
Наряд
паратов

детельствуют, что целенаправленная модификация структуры молекул естественных энкефалинов может явиться важной основой для создания высокоэффективных анальгетических соединений.

Не обосновывая рациональность клинического применения аналогов энкефалинов, нам представляется необходимым подчеркнуть еще некоторые особенности этих синтетических молекул. В частности, следует иметь в виду наличие разного аффинитета к опиатным рецепторам у некоторых производных по сравнению с мет- и лей-энкефалинами. Установлено, что в присутствии бацитрацина, блокирующего ферментное расщепление пептидов, молярные соотношения, вызывающие 50% ингибицию связывания [^3H]-налоксона с опиатными рецепторами, различаются для лей-энкефалина, мет-энкефалина и мет-энкефалинамида. ID_{50} последнего соответствовала таковой морфина. При увеличении концентрации Na^+ в инкубационной среде среди вышеназванных соединений наиболее эффективным лигандом оказался морфин. Однако мет-энкефалинамид в этих условиях связывался в 3 раза менее значительно, чем мет-энкефалин. Это позволяет характеризовать амидное производное как более чистый агонист по сравнению с естественным опиоидным пептидом [Pert C. B. et al., 1977; Puig M. M. et al., 1977].

В то же время имеются наблюдения, указывающие на существование синтетических производных энкефалинов и с противоположными свойствами. Примером может служить N-алил[D-ала 2]-мет-энкефалин, молярная концентрация связывания которого с опиатным рецептором практически не изменяется под действием Na^+ . Это соединение обладает слабым анальгетическим действием при введении в организм и вызывает явления абстиненции при инъекции животным с экспериментальной физической зависимостью от морфина. Приведенные данные позволяют сделать заключение о возможности создания на пептидной основе препаратов, имеющих свойства антагонистов опиатов. Заманчиво предположить, что такие производные в результате более специфического взаимодействия с δ -рецепторами могут с большим успехом блокировать эффекты естественных агонистов, чем непептидные антагонисты.

Наряду с разработкой активных синтетических препаратов на основе энкефалинов предпринимаются уси-

ния при помощи различных заместителей модифицировать эффекты естественных эндорфинов [Yamashiro D. et al., 1977; De Wied D. et al., 1978; VanRae J. M. et al., 1978]. Опиоидная активность дериватов β -эндорфина с замещением 1-го, 2-го, 3-го, 4-го и 5-го аминокислотных остатков на D-изомеры изучена *in vitro* при использовании препаратов подвздошной кишки морских свинок и *in vivo* в случае внутрижелудочкового и внутривенного введения. В первом случае оценивалась их связь с рецептором, во втором — анальгетическая активность. Найдено, что замещение гли² в молекуле β -эндорфина на D-аланин снижает более чем на 50% аффинитет пептида к опиатному рецептору по сравнению с естественным лигандом, активность которого принималась за 100%. [D-фен⁴]- и [D-мет⁵]-аналоги в незначительной степени ингибировали электростимулированное сокращение препарата подвздошной кишки (4% от активности эндорфина), а [D-тир¹]-производное практически не влияло на этот показатель. В экспериментах с внутрижелудочковым введением только [D-ала²]- β -эндорфин по способности вызывать анальгезию соответствовал естественному пептиду, другие же аналоги были не активны. При внутривенном введении β -эндорфин оказался активнее [D-ала²]-аналога.

Таким образом, с одной стороны, эти результаты свидетельствуют о важном значении первых пяти аминокислот в молекуле β -эндорфина для проявления специфического действия; с другой — о некоторых особенностях, не характерных для аналогичных замещений в молекулах энкефалинов. В частности, [D-ала²]- β -эндорфин при внутривенном введении был менее активен как анальгетик, в то время как [D-ала²]-аналог энкефалинов превышал по выраженности действия естественный лиганд. Выше отмечались также существенные различия в биологической активности [D-ала²]- β -эндорфина в опытах *in vivo* и *in vitro*, что может быть связано как с особенностями биотрансформации молекулы пептида, так и с различиями аффинитета к опиатным рецепторам мозга и нейронов мезентериального нервного сплетения.

Заканчивая изложение материала о свойствах аналогов опиоидных пептидов, необходимо упомянуть еще об одном интересном синтетическом производном эндорфинов, а именно о дез-тирозин- γ -эндорфине (ДТ γ Э). Этот пептид, как оказалось, не обладая свойствами опи-

атов, про
препарат
резистент
ствия это
очевидно,
действия
и заключа
менении у
психотроп

Несомн
тверждаю
чение отк
черкивают
ской оцен
производн
ние на Ц
их аффин
способност
определен
не тщател
зиологичес
групп пси

ФР
ОП

Из

веденчески
тидов, вы
ствия. Уч
нейропепт
вительност
внимание
ским свой
ческих ан
вать эти с

Обезбо
тесту «отд
этих пент
в латерал
становке
небольшо
должалас
при введе

атов, проявляет себя как очень активный психотропный препарат при лечении шизофрении, особенно у больных, резистентных к действию нейролептиков. Механизм действия этого соединения еще не ясен. Во всяком случае очевидно, что он не связан с основными типами взаимодействия известных нейролептиков. В этой особенности и заключается, по-видимому, его преимущество при применении у части больных, резистентных к традиционным психотропным препаратам.

Несомненно, приведенные сведения еще раз подтверждают большое биологическое и медицинское значение открытых опиоидных пептидов. Они также подчеркивают то обстоятельство, что при фармакологической оценке этих соединений, особенно синтетических производных, необходимо широко исследовать их влияние на ЦНС не только в плане анализа выраженности их аффинитета к классическим опиатным рецепторам, способности к аналгетическому действию и развитию определенных поведенческих реакций, но также и в плане тщательного изучения других биохимических и физиологических параметров, характерных для различных групп психотропных препаратов.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ И МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОПИОИДНЫХ ПЕПТИДОВ

Изучение фармакологических, в том числе и поведенческих свойств эндогенных морфиноподобных пептидов, выявило широкий спектр их биологического действия. Учитывая гипотезу S. H. Snyder о роли этих нейропептидов в механизмах проведения болевой чувствительности, представляется логичным, что большое внимание исследователей было привлечено к аналгетическим свойствам энкефалинов, эндорфинов и их синтетических аналогов. Мы считаем необходимым суммировать эти сведения.

Обезболивающее действие энкефалинов выявлено по тесту «отдергивание хвоста» („tail-flick“) при введении этих пентапептидов в интервале доз от 100 до 200 мкг в латеральный желудочек мозга крыс. При такой постановке эксперимента аналгезия развивалась после небольшого латентного периода (около 2—6 мин) и продолжалась не более 10—12 мин. Следует отметить, что при введении в больших дозах несколько более выра-

женные аналгетические свойства присущи лей-энкефалину. Тем не менее оба опиоидных пентапептида как обезболивающие средства более чем на порядок слабее морфина. Действительно, для того чтобы воспроизвести степень обезболивания, обусловленную интравентрикулярным введением 10 мкг морфина, необходимо тем же способом ввести 200 мкг энкефалина, причем в отличие от последних эффект алкалоида длится более 1 ч [Belluzzi J. D. et al., 1976].

В более подробных исследованиях указывается, что введение лей-энкефалина в боковой желудочек мозга сопровождается уменьшением амплитуды вызванных потенциалов в вентролатеральных столбах спинного мозга на 30—50%, которое более выражено с контралатеральной по отношению к раздражаемому нерву стороне. Происходило также угнетение сегментарной синаптической передачи в спинном мозге: амплитуда моносинаптического ответа снижалась на 15—20%, а полисинаптического — более чем на 50%. Повторные внутрижелудочковые введения лей-энкефалина не сопровождались явлениями тахифилаксии. Налоксон блокировал указанные эффекты, если вводился через 3—5 мин после лей-энкефалина и препятствовал развитию действия последнего при предварительном введении. В то же время лей-энкефалин не изменял амплитуды вызванных потенциалов, возникающих в двигательной ветви нижнечелюстного нерва при раздражении язычного нерва. На ЭЭГ в период действия пентапептида обнаружено появление судорожных разрядов, выявлено также уменьшение амплитуды вызванных потенциалов в I соматосенсорной зоне коры головного мозга [Фисенко В. П. и др., 1979]. Авторы также показали, что метилсергид, являющийся блокатором серотонинергических рецепторов, уменьшает действие лей-энкефалина на спинной мозг. Делается вывод, что влияние изученного энкефалина на нейроны спинного мозга обеспечивается активацией нисходящих тормозных влияний, возможным медиатором которых является серотонин.

Слабую и непродолжительную аналгетическую активность естественных энкефалинов связывают с их неустойчивостью к ферментативной инактивации. Более устойчивые в этом отношении аналоги, к тому же имеющие повышенный аффинитет к опиатным рецепторам, проявляют и более высокую аналгетическую способ-

ность. Та
превосхо
жается к
эффекта

Среди
тельная
β-эндорф
нии в 34
фином, к
дергиван
что анал
1 ч и р
препарат
линов, б

Разно
зываемы
ковом вв
явление
при моде
стояние
мокрой
поведенч
полнители
тагонист
кефалино
шей, при
ет с анал
от них
ствии на

[Wei E.
предотвр
ей CO₂.
(100—20
обоих пе
ших кол
Данный
фическим
типами
налоксон

Изуче
помощи
прессии
результ
де, пока

ность. Так, [D-ала², D-лей⁵]-энкефалин почти в 32 раза превосходит морфин, а [D-ала²]-мет-энкефалин приближается к последнему по интенсивности анальгетического эффекта [Wei E. T. et al., 1977].

Среди известных естественных эндорфинов значительная обезболивающая активность присуща только β-эндорфину, который при внутрижелудочковом введении в 34,7 раза более эффективен по сравнению с морфином, когда аналгезия регистрируется по тесту «отдергивание хвоста» [Wei E. T. et al., 1977]. Характерно, что аналгезия, вызванная β-эндорфином, длится более 1 ч и развивается даже при внутривенном введении препарата. Действие эндорфина, так же как и энкефалинов, блокируется налоксоном.

Разнообразен и спектр поведенческих реакций, вызываемых опиоидными пептидами. При внутрижелудочковом введении мет-энкефалина крысам отмечается появление симптомов «отмены наркотика», возникающих при моделировании абстиненции. Их характеризуют состояние возбуждения, чиханье, симптом «отряхивания мокрой собаки» и др. [Leybin H. et al., 1976]. Такие поведенческие особенности действия мет-энкефалина дополнительно подтверждают его смешанные агонист-антагонистические свойства. Синтетические аналоги энкефалинов стимулируют двигательную активность мышей, причем этот эффект достаточно четко коррелирует с анальгетической активностью препаратов. В отличие от них β-эндорфин при сильном обезболивающем действии на локомоцию влияет крайне незначительно [Wei E. T. et al., 1977]. Как лей- так и мет-энкефалины предотвращают амнезию у крыс, вызванную анестезией CO₂. В отличие от анальгезирующих доз энкефалинов (100—200 мкг) центральное антиамнестическое действие обоих пентапептидов проявляется при введении небольших количеств препарата (от 0,3 до 30 мкг на крысу). Данный эффект, по-видимому, не обусловлен специфическим связыванием энкефалинов с классическими типами опиатных рецепторов, так как не ингибируется налоксоном [Rigter H. et al., 1977].

Изучение поведенческих эффектов энкефалинов при помощи теста, моделирующего на крысах состояние депрессии и пассивности, развивающихся у животных в результате многократного и длительного плавания в воде, показало, что оба пентапептида при внутривенном

введении в дозе 1 мг/кг уменьшают период начальной неподвижности крыс, характеризующий «отчаяние», и увеличивают время плавания животных и их активность [Kastin A. J. et al., 1978].

Центральное введение энкефалинов крысам сопровождается выраженной и длительной эпилептоподобной активностью, регистрируемой на ЭЭГ. Эффект более выражен при введении лей-энкефалина по сравнению с мет-энкефалином и в обоих случаях блокируется налоксоном. В отличие от морфина эпилептоидные свойства энкефалинов проявляются в дозах, вызывающих лишь незначительную аналгетическую реакцию. Эти наблюдения хорошо согласуются с известным ранее судорожным действием опиатов и указывают на физиологическое значение энкефалинов в регуляции тонуса нервно-мышечной системы [Фисенко В. П. и др., 1979; Frenk H. et al., 1978]. Однако основной или по крайней мере наиболее значимой функцией энкефалинов в ЦНС является их роль как природных «эйфориенов и медиаторов удовольствия» [Belluzzi J. D., Steing L., 1977]. Экспериментальным основанием этого постулата послужили следующие данные, полученные на крысах. Авторы показали, что животные быстро обучаются самовведению энкефалинов, равно как и морфина, в латеральный желудочек мозга. Кроме того, электрическая самостимуляция околоводопроводного серого вещества, моделирующая состояние удовольствия, предотвращается введением налоксона.

В настоящее время позитивные эмоциональные влияния психотропных препаратов, в частности нейролептиков типа галоперидола, связывают с их способностью повышать содержание энкефалинов в полосатом теле мозга за счет увеличения их синтеза [Hong J. S. et al., 1978, 1979]. Именно эйфорический эффект энкефалинов, по-видимому, предопределяет их наркотенные свойства. Длительная инфузия мет-энкефалина через канюлю, имплантированную в область периаквадукта, приводит к развитию классических признаков физической зависимости [Wei E. T., Loh H., 1976].

Наркотенные свойства выявлены и у β -эндорфина в аналогичных экспериментах [Wei E. T., Loh H., 1976]. Выявлено развитие пристрастия к β -эндорфину и в экспериментах по внутрижелудочковому самовведению этого пептида крысам [VanRee J. M. et al., 1979].

Пове
весьма
атных
ражений
финов
акведук
ание н
движен
ложени
ностью,
действи
состоян
после и
ношении
вторных
ность [1
Выр
шек пр
ние раз
12 мкг
мами:
периоди
щее воз
на опре
lio M. е
трактук
Подобн
исследо
аналгез
мечаетс
Пом
нов β -э
мокрой
мена Ц
 β -эндор
[Tseng
через 6
зывает
ключен
ляции
ется у
у гипос
1978].
подавл

Поведенческие характеристики эффекта эндорфинов весьма специфичны и во многом отличаются как от опиатных алкалоидов, так и от энкефалинов. Наиболее выраженным психотропным действием из известных эндорфинов обладает β -аналог. Внутрижелудочковое и периаквадуктальное введение его крысам индуцирует состояние неподвижности, характеризующееся отсутствием движений, частичной утратой рефлекса правильного положения тела и генерализованной мышечной ригидностью, доходящей до каталепсии. Фазе ригидности при действии β -эндорфина предшествует кратковременное состояние гиперактивности. Все эти явления исчезают после инъекции налоксона. Важно отметить, что по отношению ко всем вышеописанным эффектам при повторных введениях β -эндорфина развивается толерантность [Bloom K. et al., 1976; Segal D. S. et al., 1977].

Выраженное действие β -эндорфин оказывает на кошек при центральном введении. Стереотипное поведение развивается уже через 15—20 мин после инъекции 12 мкг препарата и выражается следующими симптомами: небольшой тремор головы, сопровождающийся периодическими резкими и быстрыми движениями, общее возбуждение, фиксация взора в пространстве или на определенных предметах, расширение зрачков [Meglio M. et al., 1977]. Частично эту симптоматику авторы трактуют как проявление «зрительных галлюцинаций». Подобные поведенческие эффекты наблюдаются у всех исследованных животных в течение 1 ч, в то время как аналгезия при введении β -эндорфина в данной позе отмечается лишь у части животных.

Помимо описанных реакций, у лабораторных грызунов β -эндорфин может вызывать синдром «отряхивания мокрой собаки», угнетение дыхания, появление феномена Штрауба. Имеются также сведения об участии β -эндорфина в температурной адаптации организма [Tseng L. et al., 1977]. Установлено, что этот пептид через 60 мин после введения в мозговой желудочек вызывает снижение температуры тела на 4°C . Именно исключением под действием β -эндорфина негативной регуляции температуры тела в настоящее время объясняется угнетение гипертермического эффекта налоксона у гипофизэктомированных животных [Holaday J. et al., 1978]. Аналогично морфину β -эндорфин дозозависимо подавляет фиксированное поведение крыс, выработанное

при помощи пищевого подкрепления. Причем этот эффект β -эндорфина в 21 раз более выражен по сравнению с опиатным алкалоидом [Lichblau L. et al., 1977].

Глубокие изменения поведения, сопровождающие введения эндорфинов, привели к заключению, что система « β -липотропин — эндорфин» вовлечена в регуляцию «нормального поведения» и нарушение функции этой системы может сопровождаться возникновением патологических вариаций в поведении животных, а также обуславливать развитие психических расстройств у человека [Guillemin R., 1977]. Особое внимание психиатров привлек тот факт, что поведенческая стереотипия, вызываемая эндогенными морфиноподобными соединениями в эксперименте (кататония, дисфория), имеет соответствующие аналоги в психиатрической клинике. Такое сопоставление привело к заключению о возможном участии эндогенных опиоидных пептидов в патогенезе психических заболеваний. Действительно, удалось показать увеличение содержания эндорфинов при шизофрении, которое коррелировало с тяжестью болезни. Введение нейролептиков таким больным сопровождалось значительным снижением уровня этих пептидов [Terenius L. et al., 1976]. Выраженные колебания содержания опиоидных пептидов в крови и спинномозговой жидкости при маниакально-депрессивном психозе, а также в неврологической практике при наличии длительного болевого симптома, подтверждают универсальность влияния эндорфинов и энкефалинов на функцию как центральной, так и периферической нервной системы. Необходимо, однако, отметить, что при клиническом использовании β -эндорфин неоднозначно влияет на выраженность психотической симптоматики. Клинические наблюдения показывают, что введение этого пептида больным шизофренией в суточной дозе от 1,5 до 6 мг сопровождается ухудшением состояния. Напротив, введение тех же доз препарата пациентам с выраженной депрессией характеризовалось кратковременной нормализацией психики [Kline N. S. et al., 1977].

В связи с тем что у части психически больных регистрируется повышенное содержание эндогенных морфиноподобных соединений, эффект которых, как было известно из эксперимента, блокируется налоксоном, последний был использован для купирования психических расстройств. При этом установлено, что внутривенное

введение на
«Наркан») —
стояния у
тельными и
et al., 1977].
высокого со
пешное при
ей. Особенно
формах забо
макологичес
1977].

В то же
нов в патог
ясна. Можно
рушение пси
бытка, а, н
ных лиганд
исходя из со
ствия психо
улучшать к
становятся
сти больных
вождается
раноидных
поведенческ
показано в
тие фазы д
et al., 1977].
ми наблюде
 β -эндорфина
френией, ди
в трактовке
ролептика.

Выше мы
ский эффект
френией де
фина (ЛТГ)
ства этого
аналгетичес
после его ве
ние, исчезал
с тем мех
по-видимому
пептидов, та

введение налоксона (название клинического препарата «Наркан») вызывает нормализацию психического состояния у части больных, особенно страдающих зрительными и слуховыми галлюцинациями [Terenius L. et al., 1977]. С нейтрализацией нежелательного влияния высокого содержания эндогенных пептидов связано и успешное применение гемодиализа у больных шизофренией. Особенно эффективной такая терапия оказалась при формах заболевания, резистентных к традиционным фармакологическим препаратам [Wagemaker H., Cade R., 1977].

В то же время следует отметить, что роль эндорфинов в патогенезе психических заболеваний до конца не ясна. Можно полагать, что в определенных условиях нарушение психики будет происходить не в результате избытка, а, напротив, при дефиците эндогенных опиоидных лигандов в организме. Именно в этих условиях, исходя из современных представлений о механизме действия психотропных препаратов, нейролептики будут улучшать клиническое состояние больных. В этой связи становятся понятны и наблюдения, что у небольшой части больных шизофренией введение β -эндорфина сопровождается исчезновением слуховых галлюцинаций и параноидных идей. Однако при сравнении в эксперименте поведенческих эффектов β -эндорфина и галоперидола показано в случае пептида, но не нейролептика, развитие фазы двигательной гиперреактивности [Segal D. S. et al., 1977]. Эти данные в сочетании с многочисленными наблюдениями, указывающими на высокий уровень β -эндорфина в спинномозговой жидкости больных шизофренией, диктуют необходимость большой осторожности в трактовке действия β -эндорфина как эндогенного нейролептика.

Выше мы уже упоминали, что хороший терапевтический эффект был получен при инъекции больным шизофренией деривата γ -эндорфина — дез-тирозин- γ -эндорфина (ЛТГ₆₂₋₇₇). Выраженные нейролептические свойства этого пептида сочетались с полным отсутствием анальгетической активности. В течение нескольких суток после его введения у больных улучшалось общее состояние, исчезал бред и уменьшались галлюцинации. Вместе с тем механизм действия дез-тирозин- γ -эндорфина, по-видимому, существенно отличается как от опиоидных пептидов, так и нейролептиков. В пользу последнего го-

ворит высокая эффективность ЛТГ₆₂₋₇₇ у больных, резистентных к галоперидолу. Имеется предположение, что сходные с нейролептиками эффекты опиоидных пептидов обусловлены блокадой системы дофаминергической регуляции в полосатом теле мозга [Van S., 1978]. Как известно, блокада дофаминовых рецепторов полосатого тела сопровождается развитием каталепсии и, напротив, повышение уровня дофамина в этом отделе мозга приводит к появлению гиперкинезов. Показательно, что эндорфины обладают выраженной тропностью к этой области мозга, и чрезвычайно низкие концентрации β -эндорфина (10^{-18} М) в гомогенате полосатого тела вызывают значительное подавление активности дофаминзависимой аденилатциклазы. Нейролептики также блокируют дофаминергическую передачу нервных импульсов, что и обуславливает сходные фармакологические эффекты. Однако наряду с этим нейролептические препараты, в частности галоперидол, стимулируют в полосатом теле синтез мет-энкефалина [Hong J. S. et al., 1978]. Следует отметить, что еще в 50-е годы эту область мозга определяли как структурное образование, входящее в центральную систему reward (удовольствие, поощрение), в отличие от системы punishment (избегание, отвращение), связанной с холинергической и серотонинергической медиацией проведения нервных импульсов. Полагают, что нарушение мотивационной системы удовольствия влечет за собой изменения в поведении и мышлении. Так, у больных шизофренией локальное раздражение зон «удовольствия» не вызывает положительных эмоций. Можно предположить, что дефект эмоционального статуса этих больных обусловлен повышенным образованием эндорфинов. Последние же, как было сказано выше, ингибируют деятельность дофаминергической системы полосатого тела. Нейролептики при той же локализации и направленности действия, увеличивая синтез энкефалинов, вполне понятным образом положительно влияют на систему reward [Hong J. S. et al., 1979]. Следует отметить, что локально повышенный синтез энкефалинов обеспечивает и терапевтическую эффективность акупунктуры и психотерапии.

Оценивая возможность развития психических расстройств с учетом роли опиоидных пептидов, следует иметь в виду не только количественные вариации в содержании этих соединений. Патологические изменения,

связанные с
ции проведен
и в результ
следнем сл
ластях моз
нормальных
сокоспециф
вации, мож
женных спе
нехарактер
нуждаются,
изучении.

связанные с рассматриваемой здесь системой модуляции проведения нервных импульсов, могут происходить и в результате нарушения их локализации в мозге. В последнем случае накопление опиоидных пептидов в областях мозга, не предназначенных для их влияния в нормальных физиологических условиях и лишенных высокоспецифических ферментов для их быстрой инактивации, может приводить или к появлению более выраженных специфических эффектов, или к возникновению нехарактерных психогенных свойств. Все эти вопросы нуждаются, несомненно, в дальнейшем тщательном изучении.

Глава 3

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ АНАЛГЕТИКОВ НА УРОВНЕ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ НЕРВНЫХ ИМПУЛЬСОВ

Основным этапом в процессе реализации биологической активности опиатов является их влияние на синаптическую передачу. Стерeosпецифическое взаимодействие с рецепторами и образование при этом опиоид-рецепторного комплекса приводит к определенным изменениям физико-химических характеристик мембран, что в свою очередь обуславливает начало целого ряда биохимических превращений в пре- и постсинаптических нейронах. Кроме того, изменения структурно-функциональных характеристик синапсов лежат в основе развития толерантности и зависимости специфических проявлений при хроническом введении наркотиков (наркомании).

Рассматривая проблему в целом, следует отметить, что весь процесс влияния опиатов на синаптическую передачу можно условно разбить на три последовательных этапа: 1) взаимодействие с рецепторами и образование опиоид-рецепторного комплекса; 2) изменение структуры синаптической мембраны и как следствие этого изменение ее проницаемости для ионов и метаболитов, активности мембраносвязанных ферментов и конформации рецепторов для различных нейромедиаторов; 3) изменение скорости кругооборота нейромедиаторов и проведения нервного импульса.

В данной главе рассматриваются два последних этапа, поскольку первый был в необходимой мере разобран (см. главы 1 и 2). Так как в вопросе об изменении мембраносвязанных систем наиболее важным является механизм влияния опиатов на аденилат- и гуанилатциклазные системы, то мы изложим эти сведения более подробно.

ОП
Во
отидов в
тидов и в
ской зави
ся большо
наблюдени
щие урове
га, способ
ности, им
(ФДЭ) —
щий повы
гезирующе
et al., 197
теренол, и
и подавля
[Bhargava
животным
способств
зависимос
основой д
морфина
клеток, ко
ких модел
стомы и
мозга и о
тах, получ
Гибрид
было отм
делью, по
могенную
ствительну
атциклазу
сродство
цепторов
Резуль
к р а т н о
и стимул
центрацию
ингибирую
натах [Sh
связи с э
действия

Вопросу об участии системы циклических нуклеотидов в механизме действия опиатов и опионидных пептидов и в процессе развития толерантности и физической зависимости к наркотическим веществам уделяется большое внимание. Начало этому было положено наблюдениями, согласно которым вещества, изменяющие уровень циклического АМФ (цАМФ) в ткани мозга, способны влиять и на морфинную аналгезию. В частности, имидазол — стимулятор фосфодиэстеразы цАМФ (ФДЭ) — и пропранолол, β -адреноблокатор, редуцирующий повышение уровня цАМФ, увеличивали время анальгезирующего эффекта морфина у мышей [Contreiras E. et al., 1972]. Другой β -адреноблокатор — дихлоризопроterenол, кроме того, замедлял развитие толерантности и подавлял вызываемый налоксоном синдром отмены [Bhargava H. N. et al., 1972]. Внутривенное введение животным непосредственно цАМФ также значительно способствовало развитию толерантности и физической зависимости [Ho J. K. et al., 1973]. Эти данные явились основой для детального изучения характера влияния морфина и других опиатов на уровень цАМФ внутри клеток, которое проводилось с использованием нескольких модельных систем: гибридных клеток из нейробластомы и глиомы, гомогенатов и тонких срезах целого мозга и отдельных его областей, а также на гомогенатах, полученных из гладкомышечной ткани.

Гибридные клетки из нейробластомы и глиомы, как было отмечено (см. главу 1), являются удобной моделью, поскольку представляют собой относительно гомогенную культуру, содержащую, с одной стороны, чувствительную к воздействию многих веществ аденилатциклазу (АЦ), а с другой — опиатные рецепторы, сродство которых к наркотикам близко к таковому рецепторов мозга.

Результаты исследований показали, что однократное воздействие морфина подавляет базальную и стимулированную простагландином E_1 (ПГЕ₁) концентрацию цАМФ в интактных гибридных клетках и ингибируют активность аденилатциклазы в их гомогенатах [Sharma S. L. et al., 1975]. Некоторые авторы в связи с этим полагают, что преимущественным местом действия морфина в чувствительной клетке является

ПГЕ₁-стимулируемая АЦ [Collier H. O., Roy T., 1974]. Относительное сродство различных левовращающих стереоизомеров к опиатным рецепторам гибридов хорошо согласовалось с их активностью в качестве ингибиторов АЦ и с анальгетической активностью. Фармакологически неактивный стереоизомер декстрорфан не оказывал влияния на уровень цАМФ.

Интересно, что морфин подавлял стимулирование ПГЕ₁ уровня цАМФ родительских клеток нейробластомы N18TG-2 и не влиял на стимулированный уровень нуклеотида в родительских клетках глиомы CEBU-1. Аналогичная картина наблюдалась и при использовании гомогенатов исходных клеток (до гибридизации). Налоксон снимал ингибирующее влияние морфина на АЦ-активность гомогенатов нейробластомы N18TG-2 [Sharma S. L. et al., 1975]. Таким образом, можно предполагать о наличии двух типов АЦ, один из которых чувствителен, а другой — резистентен к наркотикам. Кроме того, возможно, что данный факт обусловлен различием в числе опиатных рецепторов на поверхности клеток.

При длительном (на протяжении 4 сут) культивировании гибридных клеток в присутствии морфина на фоне или без ПГЕ₁ вслед за первоначальным снижением наблюдалось постепенное увеличение специфической активности АЦ, которая через 2—3 сут инкубации приближалась к контрольным значениям. Через 24 ч после удаления наркотика из культуральной среды после 3-суточного инкубирования происходило прекращение увеличения активности АЦ. Обсуждая полученные результаты, авторы пришли к заключению, что в механизме длительного действия морфина можно выделить два последовательных этапа. Первый этап заключается в обратимом ингибировании АЦ, которое приводит к снижению внутриклеточного уровня цАМФ. Вторым этапом начинается вслед за предыдущим и характеризуется поздней позитивной регуляцией активности АЦ. Она развивается через 12 ч инкубации с наркотиками или позднее и выражается в постепенном увеличении активности фермента. Эффекты наркотиков на ингибирование АЦ и на ее позитивную регуляцию являются специфическими и снимаются налоксоном.

Механизм позитивной регуляции активности АЦ пока еще не достаточно ясен. Тот факт, что наблюдается

повышен
активнос
ной актив
регуляци
Важная
подтверж
данным
тых гибр
ствии мо
ных клет
кул АЦ, и
личение
или в дей
ся в сина
показано,
рость син
наиболее
вестно, чт
теинкиназ
ных внутр
форилиро
мента, а д
образом,
влиянием
процесса
го к повы
активности
регуляци
ду не уве
увеличени
Весьма
следовани
стему кле
(1971) по
фин не вл
мозжечке
лучены А.
через 1 ч
тивности
К. D. С
ли, что од
тельно вл
время набл
при дозе м

повышение базальной, ПГЕ₁ и аденозинстимулированной активности АЦ и относительная стабильность повышенной активности, позволяет предполагать, что позитивная регуляция заключается в увеличении числа молекул АЦ. Важная роль молекул АЦ как лимитирующего фактора подтверждается и тем, что число опиатных рецепторов, по данным S. L. Sharma и соавт. (1975), в хорошо отмытых гибридных клетках, проинкубированных в присутствии морфина, не отличалась от такового в контрольных клетках. Однако, говоря об увеличении числа молекул АЦ, необходимо решить вопрос, является ли это увеличение следствием синтеза новых молекул фермента, или в действие включаются «резервные», уже имеющиеся в синаптической мембране? Поскольку в ряде работ показано, что морфин не оказывает влияния на скорость синтеза белка в течение 9 сут клеточного роста, наиболее вероятным кажется следующий механизм. Известно, что цАМФ, связываясь со специфической протеинкиназой, обуславливает фосфорилирование различных внутриклеточных белков, в том числе и АЦ. Фосфорилирование АЦ приводит к инактивированию фермента, а дефосфорилирование — к его активации. Таким образом, имеющее место снижение уровня цАМФ под влиянием опиатов будет приводить к превалированию процесса дефосфорилирования АЦ и как следствие этого к повышению общей суммарной аденилатциклазной активности. Поэтому, говоря о механизме позитивной регуляции активности АЦ, очевидно, следует иметь в виду не увеличение общего числа молекул фермента, а увеличение числа функционирующих молекул.

Весьма противоречивые результаты получены при исследовании влияния опиатов на аденилатциклазную систему клеток мозга. В работе K. Naito и K. Kuriyama (1971) показано, что вводимый однократно морфин не влиял на активность АЦ и ФДЭ в коре мозга, мозжечке и гипоталамусе. Аналогичные результаты получены A. Chau и соавт. (1971), однако в коре мозга через 1 ч после инъекции наблюдалось повышение активности АЦ.

K. D. Charalampous и W. E. Askew (1977) сообщили, что однократное введение морфина мышам незначительно влияло на активность ФДЭ мозжечка. В то же время наблюдалось выраженное снижение уровня цАМФ при дозе морфина 20 мг/кг, хотя при однократном вве-

дении 40 мг/кг морфина изменений в уровне цАМФ не выявлялось.

U. Havemann и K. Kuschinsky (1978) инкубировали тонкие срезы полосатого тела мозга крыс в обогащенном K^+ деполяризованном растворе в присутствии морфина, морфина и налоксона одновременно, а также леворфаноло или декстрорфана. При этом происходило снижение уровня цАМФ под влиянием морфина (5 мкМ) и указанная концентрация была максимально эффективна. Однако в присутствии ингибитора ФДЭ 3-изобутил-1-метилксантина для значимого снижения уровня цАМФ требовалась большая концентрация морфина (20—50 мкМ). Леворфанол оказывал сходное влияние, а декстрорфан был неактивен. Налоксон ингибировал эффекты морфина.

К. А. Bonnet (1975) показал, что после инъекции морфина крысам наблюдается увеличение уровня цАМФ в хвостатом ядре, сопровождающееся быстрым и продолжительным снижением уровня нуклеотида в гипоталамусе. Последовательное снижение цАМФ, имеющее место в черной субстанции, происходило параллельно развитию поведенчески регистрируемой аналгезии. Значительных изменений уровня цАМФ в таламусе не наблюдалось. Возможные механизмы наблюдаемого истощения содержания цАМФ в гипоталамусе и черной субстанции, по мнению К. А. Bonnet, могут быть связаны с ингибированием ПГЕ₁-стимулируемого образования цАМФ, истощением концентрации катехоламинов в этих структурах или ранним высвобождением кальция, приводящим к быстрой активации ФДЭ.

Помимо цАМФ, в механизм действия опиатов вовлечен и другой циклический нуклеотид — цГМФ. W. E. Askew и K. D. Charalampous (1976) показали, что однократное введение 20 и 40 мг/кг морфина повышает уровень цГМФ в мозжечке мышей. Это, по мнению авторов, является результатом наблюдаемого ингибирования активности ФДЭ цГМФ. Значительное (до 200%) повышение уровня цГМФ отмечено в полосатом теле крыс [Minneman K. P., Iversen L. L., 1976], и эффект существенно зависел от дозы наркотика (рис. 15). Обращает на себя внимание противоположность изменения концентраций циклических нуклеотидов под влиянием морфина с одинаковым расположением максимума действия при 10^{-6} М последнего. Налоксон в концентрации

Хроничес

Рис. 15. Гипо
хроническом

10^{-6} М пол
ние обоих
оказывали
рядка 10^{-4}
цина. Пов
отмечается
туру клет

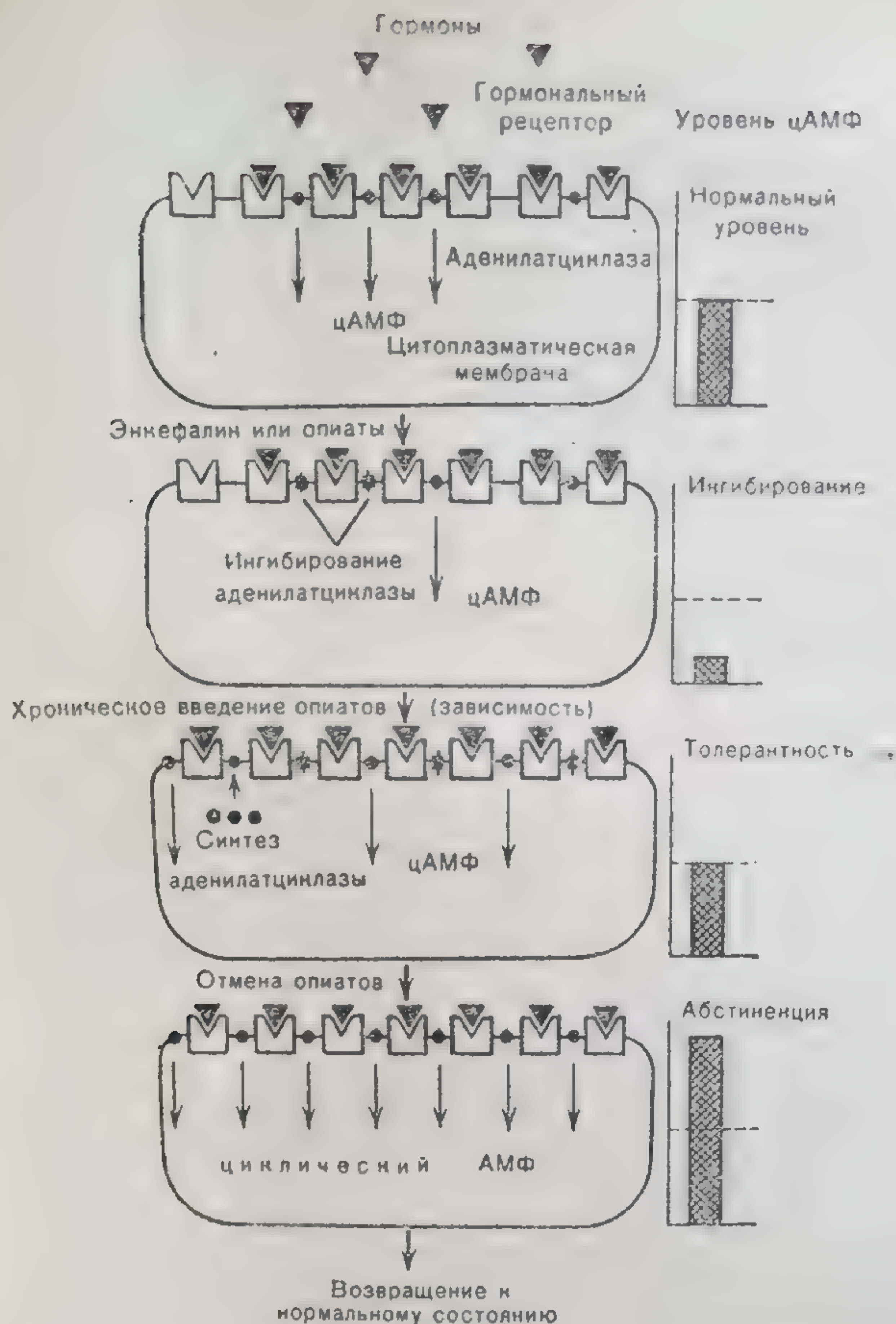


Рис. 15. Гипотетическая модель механизма действия опиатов при их хроническом введении по S. H. Snyder.

10^{-6} М полностью снимал влияние морфина на накопление обоих нуклеотидов. Сходное с морфином действие оказывали мет- и лей-энкефалины в концентрации порядка 10^{-4} М при условии добавления в среду бацитрацина. Повышение внутриклеточного содержания цГМФ отмечается при однократном введении морфина в культуру клеточных гибридов из нейробластомы и глиомы.

В то же время К. А. Bonnet (1979) наблюдал снижение уровня цГМФ в хвостатом ядре, гипоталамусе, черной субстанции и таламусе, которое было сходно по времени и выраженности с поведенчески наблюдаемой аналгезией. Обычно увеличение цГМФ в нервной системе связывается с ролью мускариновых рецепторов, а уменьшение цГМФ может отражать снижение высвобождения АХ в данных местах. Однако автор отмечает, что однородность наблюдаемых эффектов во всех четырех структурах напоминает вызываемое морфином снижение уровня кальция, происходящее быстро во всех областях мозга. Это наблюдение согласуется с исследованием N. D. Goldberg и соавт. (1973), которые также указывали, что для поддержания устойчивого уровня цГМФ крайне необходим оптимальный уровень кальция.

Изучение влияния хронического введения опиатов на клетки мозга показало, что у животных с имплантированными таблетками морфина происходит увеличение уровня цАМФ в хвостатом ядре, черной субстанции и таламусе, но не гипоталамусе [Bonnet К. А., 1979]. В отличие от временной зависимости эффектов при однократном введении морфина введение последнего толерантным животным вызывало ранний подъем цАМФ в черной субстанции, продолжающийся 5 мин, и последовательное снижение цАМФ в гипоталамусе. Уровень цАМФ в хвостатом теле не изменялся при введении морфина толерантным животным, но по отношению к интактным животным был несколько повышенным. То же отмечалось и в таламусе. В отличие от повышения цАМФ у морфинизированных животных уровень цГМФ снижался на 40% во всех четырех структурах. Дополнительное введение морфина вызывало параллельное повышение цГМФ в черной субстанции только на 1-й минуте, в таламусе — на 5-й минуте. Новое стабильное состояние уровня цГМФ было сходно с пиком эффекта морфина и, по мнению автора, отражает подавление высвобождения АХ или истощение содержания кальция.

Значительное снижение уровня цГМФ при многократном введении морфина на протяжении 24 ч наблюдали W. E. Askew и K. D. Charalamprous (1976) в мозжечке мышей. Через 72 ч подобной морфинизации уровень цГМФ возвращался к норме и даже несколько увеличивался, но отмена наркотика приводила через 76 ч к сни-

Рис. 16.
на конце
ских нук
срезах пе
На оси
ный уровне
леотидов;
оси орди
справа — ц

жению
отидов
В 19

der пре
ющую
лексного
действи
(рис. 16
со спец
цептора
вание А
внутрик
действи
введении
регулято
ние чис
подъем
котика
нием со
блокиро
ными пр
ческих
физичес
денная
мую пр
ми из н
ется об
ков на
стемы.

Взаи
циклазн
при одн
достаточ
мнению,
отношен
ного из

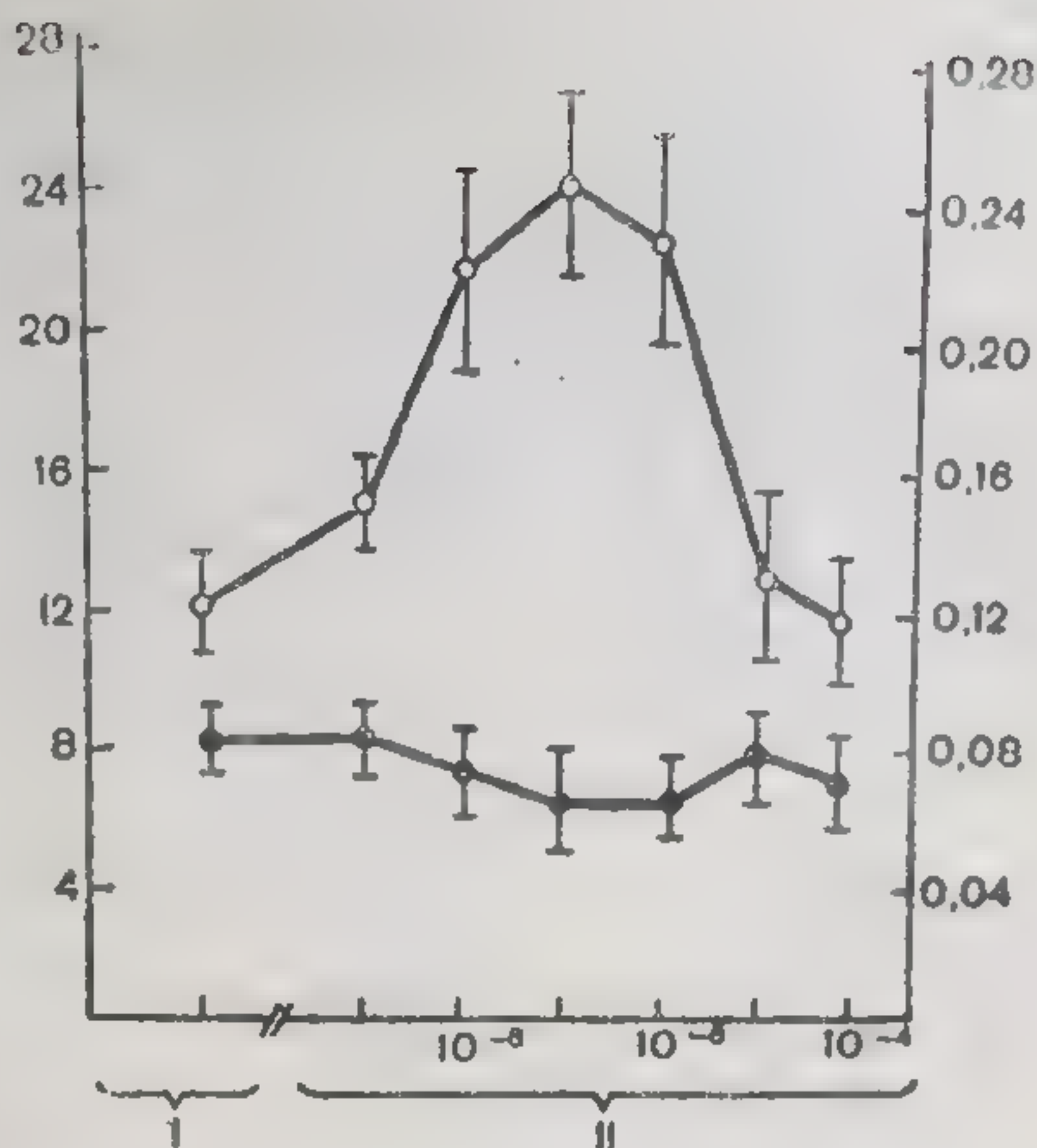
Рис. 16. Влияние морфина на концентрацию циклических нуклеотидов в тонких срезах неостриатума крыс.

На оси абсцисс — I — базальный уровень циклических нуклеотидов; II — [морфин] (М); на оси ординат — слева цАМФ, справа — цГМФ (пМ/мг белка).

жению уровня нуклеотидов до 40%.

В 1975 г. S. H. Snyder предложил следующую модель комплексного механизма действия наркотиков (рис. 16). Связываясь со специфическими рецепторами, наркотики (морфин) вызывают ингибирование АЦ, что в свою очередь приводит к понижению внутриклеточного уровня цАМФ. В том случае, если действие наркотика продолжается (при хроническом введении), в первой клетке включаются вторичные регуляторные механизмы, обуславливающие увеличение числа молекул АЦ, и, таким образом, происходит подъем цАМФ до нормальных значений. Отмена наркотика в этом случае сопровождается резким повышением содержания цАМФ в результате активации «заблокированных» ранее молекул фермента. Именно данными процессами объясняется развитие таких специфических проявлений наркоманий, как толерантность и физическая зависимость. Нетрудно видеть, что приведенная схема в принципе отражает картину, наблюдаемую при работе с гибридными клетками, полученными из нейробластомы и глиомы, и, очевидно, определяется общими закономерностями влияния наркотиков на функционирование аденилатциклазной системы.

Взаимосвязь между аденилатциклазной и гуанилатциклазной системой в процессе реализации эффектов при однократном и хроническом введении опиатов не достаточно изучена, однако все больше склоняются к мнению, что наиболее важным показателем является соотношение цАМФ/цГМФ, нежели изменение уровня одного из нуклеотидов.



ОПИАТЫ И НЕПРОМЕДИАТОРНЫЕ СИСТЕМЫ

Андренергические синапсы. Как показано в ряде работ, однократное введение морфина в сонную артерию приводило к почти мгновенному ингибированию спонтанных разрядов нейронов в полосатом теле. Это ингибирование являлось следствием увеличения дофаминергической активности в нигростриатных путях, поскольку предотвращались блокаторами дофаминовых рецепторов [Lee C. M. et al., 1977].

Повышение дофаминергической активности при введении морфина может являться результатом следующих процессов: увеличением биосинтеза дофамина, увеличением его высвобождения и снижением обратного поглощения нейромедиатора. Как известно, синтез дофамина начинается с метгидроксилирования цитоплазматического L-тирозина под влиянием тирозингидроксилазы (ТГ) с последующим декарбоксилированием путем активации декарбоксилазы ароматических аминокислот. Уровень свободного дофамина в цитоплазме нейрона регулирует скорость синтеза дофамина посредством отрицательных эффектов обратной связи на ТГ. Данный фермент лимитирует скорость образования дофамина. Другой возможный механизм регуляции заключается в изменении исходного количества предшественника тирозина для синтеза дофамина. Тирозин может подвергаться трансаминированию при помощи тирозинаминотрансферазы (ТАТ), что приводит к снижению общего содержания тирозина.

В настоящее время накоплено достаточно фактов, свидетельствующих об увеличении скорости обмена дофамина в мозге при действии морфина. В частности, найдено повышение уровня дофамина в полосатом теле, увеличение включения ^{14}C -тирозина в дофамин, а также повышение уровня гомовалиновой кислоты — основного метаболита — в полосатом теле.

Повышение обмена дофамина под влиянием морфина может быть обусловлено как увеличением внутриклеточного содержания тирозина, так и изменением активности ферментов ТАТ и ТГ. Исследуя первый возможный механизм, D. H. Clouet и A. Neidle (1970) показали, что действительно наблюдается увеличение задержки тирозина в ткани мозга в результате, как полагают, прямого влияния морфина на стереоспецифические

транспортни
центрации
мнение от
зина на об
количество
К_m ТАТ дл
вышает так
распределен
точной степ
менения в у
но отражат
было найде
(ДОФУК),
лосатом тел
розина [Clo

Вопрос о
остается спо
обнаружили
ТГ. Морфин
вания дофам
таты получе
разом, повы
кислоты в по
нено прямой
ются два воз
печивается в
ном по при
другой связа
ЦАМФ.

В настоя
морфина на
рименты с
тела выявили
мого высвоб
лось, что оди
танное высво
зов полосато
и R. C. L. W
лируемое выс
наптосом пол
морфина в ко
Вместе с т
факт, что мор
ния дофамина

транспортные системы, обеспечивающие повышение концентрации предшественника в клетках. Некоторое сомнение относительно влияния повышения уровня тирозина на обмен дофамина вызывал тот факт, что общее количество тирозина в мозге составляет 0,1 мМ, а K_m ТАТ для тирозина в полосатом теле в 500 раз превышает таковую ТГ. Отсюда следовало, что тирозин распределен равномерно, ТГ полосатого тела в достаточной степени насыщена субстратом, и какие-либо изменения в уровне тирозина в мозге не будут значительно отражаться на изменении синтеза дофамина. Однако было найдено, что и диоксифенилуксусная кислота (ДОФУК), и дофамин заметно аккумулировались в полосатом теле при непосредственном введении в него тирозина [Clouet D. H., Ratner M., 1970].

Вопрос о влиянии морфина на активность ферментов остается спорным. С. М. Lee и R. C. L. Wong (1979) не обнаружили влияния наркотика на активности ТАТ и ТГ. Морфин также не действовал на процесс ингибирования дофамином активности ТГ. Аналогичные результаты получены и другими исследователями. Таким образом, повышение уровней дофамина и гомовалиновой кислоты в полосатом теле не может быть всецело объяснено прямой стимуляцией ТГ. В связи с этим обсуждаются два возможных механизма, один из которых обеспечивается влиянием на степень ингибирования дофамином по принципу обратной связи, в то время как другой связан со стимулированием активности фермента цАМФ.

В настоящее время нет единого мнения о влиянии морфина на процесс высвобождения дофамина. Эксперименты с использованием тонких срезов полосатого тела выявили ингибирование опнатом калийстимулируемого высвобождения нейромедиатора. Также сообщалось, что однократное введение морфина снижает спонтанное высвобождение первичных аминов из тонких срезов полосатого ядра. Однако, согласно данным С. М. Lee и R. C. L. Wong (1979), ни спонтанное, ни калийстимулируемое высвобождение дофамина из гомогенатов и синапсом полосатого тела не изменялись при действии морфина в концентрации 100 мМ.

Вместе с тем практически не вызывает сомнения тот факт, что морфин снижает скорость обратного поглощения дофамина. Данный эффект считается специфичным,

поскольку полностью снимался налоксоном и не являлся следствием осмотического лизиса синапсом или быстрого высвобождения ранее поглощенного дофамина. Обсуждая важность процесса ингибирования морфинем обратного поглощения дофамина, С. М. Lee и R. C. L. Wong (1979) подчеркивают, что этот эффект может способствовать двум важным регуляторным механизмам: повышению и пролонгированию эффекта дофамина на постсинаптические нейроны, с одной стороны, и относительному снижению уровня дофамина в пресинаптическом цитозоле — с другой. Первый эффект будет приводить к увеличению уровня цАМФ вследствие активации дофаминчувствительной АЦ и далее к повышению активности ТГ в постсинаптических нейронах, поскольку активность ТГ существенно стимулируется циклическим нуклеотидом.

Этот механизм согласуется с фактом, согласно которому усиление протекания импульса в нигростриатных путях активирует ТГ полосатого тела. Второй эффект выражается в снижении ингибирования ТГ в пресинаптических нейронах по принципу обратной связи, приводя к увеличению синтеза дофамина. Очевидно, благодаря этим предполагаемым механизмам возможно объяснить увеличение дофаминергической активности и содержания дофамина, гомовалиновой кислоты и цАМФ в полосатом теле при однократном введении морфина.

В настоящее время обсуждается еще один возможный механизм увеличения обмена дофамина посредством компенсаторной его активности вследствие блокады наркотиками дофаминового рецептора на постсинаптических мембранах. В подтверждение гипотезы о вероятной блокаде рецепторов опиатами выдвигаются следующие доводы: каталептогенная активность метадона потенцируется α -метилтирозином и предупреждается апоморфином: морфин аналогично галоперидолу блокирует стереотипическое поведение, вызываемое апоморфином или амфетамином; вызываемое метадонем накопление каталептиков дофамина снимается апоморфином. Однако действие опиатов на дофаминергическую передачу может не обуславливаться прямым связыванием с дофаминовыми рецепторами, поскольку ряд авторов не обнаружили влияния морфина на характер вызываемого апоморфином стереотипического поведения, и обусловленная морфином катаlepsия более подвержена снятию

при помощи налоксона.

В то время вызывает комбинированным выражением лерантности в мозгового ниловой кинина дофаминоторами его что вызывается увеличением образования и общим употреблением тела. Если увеличиваются срезом полноты.

Большинство в процессе дофамина наблюдали в регородке, содержание валось со сдалось под истощения ние образований ДОФУК и

Помимо нической мнительности без изменений ле крыс. При этом в процессе перчувствительности после хронического снижения дофамина, агрессивности Sprague (1979)

при помощи ДОФУК, чем хлорпромазиновая ката-
лепсия.

В то время как однократное введение морфина вызы-
ывает комплекс изменений в метаболизме ДА в мозге,
хроническая наркотизация приводит к менее вы-
раженным изменениям, что указывает на развитие то-
лерантности к эффектам наркотика. Прерывание храни-
тельного введения морфина вызывало снижение синтеза
мозгового дофамина, уменьшение концентрации гомова-
ниловой кислоты в полосатом теле и замедление истоще-
ния дофамина в ткани мозга после воздействия ингиби-
торами его синтеза. Однако в ряде работ сообщалось,
что вызываемый налоксоном синдром отмены сопровож-
дается увеличением синтеза и замедлением исчезнове-
ния образованного из ^3H -тирозина меченого дофамина
и общим увеличением концентрации дофамина в полоса-
том теле. В то же время некоторые исследователи пока-
зали увеличение высвобождения дофамина из тонких
срезов полосатого тела при отмене опиатов.

Большинство авторов все еще склонны считать, что
в процессе отмены происходит увеличение содержания
дофамина в полосатом теле. Е. J. Simon и соавт. (1975)
наблюдали сходное увеличение уровня дофамина в пе-
регородке, миндалевидном теле и гиппокампе. Увеличе-
ние содержания дофамина в процессе отмены ассоцииро-
валось со снижением его утилизации, поскольку наблю-
далось подавление индуцируемого α -метилпаратирозин-ом
истощения дофамина в полосатом теле и подавле-
ние образования метаболитов — гомованиловой кислоты,
ДОФУК и 3-метокситирамина.

Помимо изменений в кругообороте дофамина при хро-
нической морфинизации происходит увеличение чувст-
вительности к дофамину дофаминчувствительности АЦ
без изменения ее базальной активности в полосатом те-
ле крыс. Полученные данные согласуются с гипотезой,
что в процессе опиатной зависимости развивается ги-
перчувствительность рецепторов дофамина. Подтверж-
дением этой гипотезы является также наблюдение, что
после хронического введения крысам морфина на фоне
сниженного обмена дофамина в полосатом теле повы-
шалась активность апоморфина, известного агониста
дофамина, и его доза, необходимая для вызывания аг-
рессивности животных, снижалась. Е. Eidelberg и R. Er-
sperger (1975) показали, что хроническое введение мор-

фина приводило к повышению чувствительности мышеч к локомоторному действию L-ДОФА и что толерантные к морфину крысы были менее чувствительны к депрессантному эффекту галоперидола. R. Shulz и A. Herz (1977) выявили значительное повышение чувствительности к катехоламинам в процессе отмены путем определения влияния дофамина, апоморфина и клонидина на интенсивность стереотипных прыжков через 3 ч после введения налоксона. Однако K. Kuschinsky (1975), изучавший эффекты апоморфина на стереотипическое поведение и дофамина на АЦ через 16—20 ч после последней инъекции морфина, не наблюдал развития гиперчувствительности дофаминовых рецепторов при хроническом введении наркотика.

Совместно с дофамином в механизм действия опиатов вовлечен и другой представитель катехоламинов — норадреналин. Показано, что морфинная аналгезия сопровождается значительным снижением уровня норадреналина в стволе мозга на фоне предварительно введенного ингибитора синтеза катехоламинов из тирозина *in vivo* α -метил- β -тирозина. В то же время другие исследователи наблюдали повышение скорости биосинтеза норадреналина в мозге при однократном введении морфина. Эти данные указывают на то, что под влиянием опиатов происходит увеличение скорости кругооборота медиатора в мозге. По данным L. Paalzow и G. Paalzow (1978), влияние морфина на метаболический кругооборот норадреналина более выражено, чем на дофамин.

Показано, что морфин и β -эндорфин снижали индуцируемое K^+ высвобождение [3H]-норадреналина в тонких срезах коры мозга крыс. Эффект обоих агонистов снимался налоксоном, что позволило авторам заключить, что норадренергические нервные окончания в коре содержат пресинаптические ингибиторные опиатные рецепторы. Активность β -эндорфина в подавлении высвобождения норадреналина была в 10 раз выше, чем морфина.

Отмечаются различия эффектов морфина на кругооборот норадреналина в зависимости от изучаемой области мозга. M. F. Sugrue (1974) обнаружил, что морфин не влияет на кругооборот медиатора в целом мозге или гипоталамусе, но значительно повышает в *medulla pons*, где эффект снимался налоксоном. Не наблюдалось влияния морфина на содержание норадреналина в коре

мозга кр
зина, но
жение кон
Хронич
вые измер
нов [Bläsi
катехолам
ло на раз
G. Per

материал
го его вве
имеющиеся
перимента
налина в
фенилокси
подавляют
время С. S
и 8-й неде
содержани
вызываемо
ное его пов
вень пора
ного при
8 нед.

Холинер
tanez (1979
щения [3H]
под влияни
морфина от
ных дозах
ко ранее
S. F. Atweh
го тела; J.
па и некото
холинергиче
ляется пря
линергическ
Паралле
происходит
тилхолина
Однако D. A
повышение
того тела кр
на 40%. Ли

мозга крыс при предварительном введении метилтирозина, но в стволе мозга происходило выраженное снижение концентрации медиатора.

Хроническое введение опиатов вызывает неустойчивые изменения в уровне норадреналина в мозге грызунов [Bläsing J., 1978]. Более того, ингибирование синтеза катехоламинов при помощи метилпаратирозина не влияло на развитие физической зависимости.

Г. Переу и соавт. (1978), анализируя литературный материал о влиянии отмены наркотика после длительного его введения, приходят к выводу, что, несмотря на имеющиеся расхождения результатов, большинство экспериментаторов обнаружили снижение уровня норадреналина в мозге животных. В частности, показано, что фенилоксибензамин и фентоламин, но не пропранолол, подавляют некоторые симптомы отмены у крыс. В то же время С. S. Mehta и W. E. Jahnson (1975) лишь на 1-й и 8-й неделях введения морфина наблюдали снижение содержания норадреналина в мозжечке при развитии вызываемого палоксоном синдрома отмены и значительное его повышение на 2-й неделе. В полосатом теле уровень норадреналина был существенно выше контрольного при прерывании введения наркотика в течение 8 нед.

Холинергические синапсы. D. A. Redburn и T. Chentanez (1979) наблюдали существенное повышение поглощения [^3H]-холина синапсами полосатого тела крыс под влиянием однократного подкожного введения морфина от 5 до 50 мг/кг, достигающее при максимальных дозах наркотика 30% от исходного уровня. Несколько ранее аналогичные результаты были получены S. F. Alweh и соавт. (1976) при исследовании полосатого тела; J. R. Simon и M. J. Kuhar (1975) — гиппокампа и некоторых других структур мозга, где имеет место холинергическая передача. Это, по мнению авторов, является прямым доказательством увеличения уровня холинергической активности.

Параллельно повышению поглощения [^3H]-холина происходит значительное снижение высвобождения ацетилхолина из клеток коры мозга [Perou G. et al., 1978]. Однако D. A. Redburn и T. Chentanez (1979) наблюдали повышение выхода ацетилхолина из синапсом полосатого тела крыс, достигающее при больших дозах морфина 40%. Анализируя подобные расхождения результа-

тов, авторы отмечают, что суть их, очевидно, заключается в качественном различии холинергической системы полосатого тела от таковой в коре больших полушарий, в частности, по чувствительности к хлорпромазину и галоперидолу.

L. G. Harsing и соавт. (1978) провели анализ влияния 8 производных энкефалинов на высвобождение ацетилхолина из тонких срезов полосатого тела крыс и показали, что, существенно не влияя на базальное высвобождение медиатора, большинство пептидов значительно повышало стимулированное высвобождение ацетилхолина. Авторы отмечают, что наблюдаемые результаты могут быть следствием либо ингибирования пептидами высвобождения дофамина из нигростриатных путей и, таким образом, повышения высвобождения ацетилхолина из промежуточных нейронов в хвостатом ядре, либо прямым стимулирующим влиянием на холинергические нейроны.

Повторные введения морфина вызывают развитие толерантности и возвращение измененных при однократном введении наркотика параметров к исходным значениям. В то же время отмена морфина сопровождается значительным увеличением активности в центральной холинергической системе. Синдром отмены характеризовался появлением таких типичных симптомов, как повышение исследовательской активности, «отряхивания мокрой собаки», прыжков, стука зубами, диареей. Эти симптомы сопровождалась увеличением выброса ацетилхолина из клеток коры мозга и повышением поглощения холина.

Повышение холинергической активности мозга в процессе отмены сопровождается изменениями в нем уровня ацетилхолина. S. Danino и K. Wilson (1975) наблюдали повышение утилизации ацетилхолина в мозге при отмене в случае хронического введения морфина более 4 сут. В то же время через 3½ сут после введения морфина налоксон не влиял на кругооборот ацетилхолина в коре, а только предупреждал снижение его уровня, наблюдаемое в полосатом теле перед введением налоксона. H. N. Bhargava и L. Way (1975) обнаружили снижение концентрации ацетилхолина в мозге при введении налоксона морфинизированным крысам, но не наблюдали этого у крыс в условиях отмены наркотика. У мышей с моделированной физической зависимостью от морфина

снижение у
рез 10 мин
нения и ув
ния наркоти

Делали
отмены путе
ков. K. Jahr
атропин и
ность, вызы
висимых ме
что у крыс
проявления
(в частност
хивание мо
предположи
дефицитом
ской систем

Хрониче
витие «фар
вительности
определено
ности нейро
toh и соавт
наблюдали
тивности мо
чем контро
перчувствит
son R. C. A

Серотон
эксперимен
о вовлечени
вание анал
фина. Уве
спинного мо
аналгезией
сти веществ
нейронов к
ем аналгет
паратов.

Поврежда
полагаются
ронов, выз
морфина. Э
воздается

снижение уровня ацетилхолина в мозге обнаружено через 10 мин после преципитированной налоксоном абстиненции и увеличение через 6 ч после прерывания введения наркотика.

Делались попытки влиять на интенсивность синдрома отмены путем введения холинолитиков и холиномиметиков. K. Jahmandas и G. Dickinson (1973) установили, что атропин и мекамиламин подавляют прыжковую активность, вызываемую налоксоном у морфин- и метадонзависимых мышей. R. C. A. Frederickson (1975) сообщил, что у крыс холиномиметики подавляли поведенческие проявления вызываемого налоксоном синдрома отмены (в частности, эзерин снимал такие симптомы, как «отряхивание мокрой собаки» и стереотипические прыжки), и предположил, что ранняя фаза отмены обуславливается дефицитом нейромедиатора в центральной холинергической системе.

Хроническое введение опиатов выявляет также развитие «фармакологической денервационной суперчувствительности» холинергических рецепторов. Это было определено R. Jagbrough (1974) при регистрации активности нейронов коры и согласовалось с данными M. Satoh и соавт. (1976) и других исследователей, которые наблюдали угнетение пилокарпином двигательной активности морфинизированных крыс в большей степени, чем контрольных. Однако рядом авторов развитие суперчувствительности не подтверждено [Frederickson R. C. A. et al., 1975, и др.].

Серотонинергические синапсы. Большое количество экспериментальных наблюдений позволяет говорить о вовлечении серотонинергической системы в модулирование анальгезии при однократном введении морфина. Увеличение активности нейронов головного и спинного мозга, содержащих серотонин, сопровождалось анальгезией и повышением антиноцицептивной активности веществ, в то время как снижение активности этих нейронов коррелировало с гипералгезией и уменьшением анальгетической активности фармакологических препаратов.

Повреждение ядер срединного шва, в котором располагаются тела нисходящих серотонинергических нейронов, вызывает снижение анальгетической активности морфина. Электрическая стимуляция этих мест сопровождается не только выраженным ингибированием ак-

тивности нейронов задних рогов спинного мозга, но также значительным анальгетическим эффектом.

Введение анальгезирующих доз морфина крысам повышало концентрацию 5-оксиндолуксусной кислоты (метаболита серотонина) в клетках спинного мозга. Временная зависимость изменения содержания 4-оксиндолуксусной кислоты в дорсальной половине спинного мозга соответствовала степени морфинной анальгезии. Повышение содержания 5-оксиндолуксусной кислоты наблюдалось и в стволе мозга при введении морфина и салицилатов, что говорит об увеличении кругооборота серотонина в мозге. В соответствии с этим находится и наблюдение Р. Aiello-Malmberg и соавт. (1979), установивших, что однократное введение морфина приводит к значительному увеличению высвобождения серотонина из нейронов коры мозга кошек и крыс в 3 и 6 раз соответственно и в 4,6 раза из нейронов хвостатого ядра у кошек.

В то же время некоторыми авторами показано, что электролитическое или при помощи 5,6-диокситриптамина повреждение серотонинсодержащих нейронов, либо истощение содержания серотонина *n*-хлорфенилаланином не влияет на антиноцицептивные эффекты морфина. Более того введение крысам триптофана, которое должно бы приводить к увеличению кругооборота серотонина в мозге, уменьшало эффект морфина.

Изучив влияние морфина и ряда других анальгетиков на поглощение триптофана клетками мозга мышей, А. Grossley и Т. Slater (1979) пришли к заключению, что нет прямой взаимосвязи между влиянием опиатов на систему серотонина и их анальгетическим действием, либо изменение уровня триптофана в мозге не является единственным и определяющим в механизме влияния опиатов на серотонинергические нейроны. Не исключено, что имеется видовая специфика наблюдаемого эффекта, поскольку в отличие от мышей у крыс налоксон снимал вызываемое морфином повышение содержания триптофана в мозге.

Спорным остается вопрос об участии серотонина в процессах развития толерантности и физической зависимости, хотя большинство исследователей утверждает, что серотонин играет очень важную роль в проявлениях хронической морфинизации. При этом отмечают значительное увеличение кругооборота серотонина в мозге. В частности, показано, что у мышей с развившейся

толерантности
рости синтез
диатора бло
белка (цикл
нием развит
висимости.
далось и пр
вторными до
сообщили, чт
вшивания мо
ротонина (п
ному замедл
зависимости.
ния количес
анальгезирую
на, необходи
ции. Кроме
массы живот
Исследовани
морфинизиро
уровень серо
толерантные,
Приведен
фенилаланин
тельствующи
мышей с раз
имплантации
ся увеличен
среднем моз
ружено и в
мозга морфи
мышей наблю
тивности три
В то же
влияние *n*-хл
лерантности
в кругооборо
ской зависимо
ноаминоокси
ГАМК-ерг
ментальных
чений ГАМК
сти в его ана
потенцируют

толерантностью к морфину наблюдается повышение скорости синтеза серотонина. Увеличение биосинтеза медиатора блокировалось введением ингибитора синтеза белка (циклогексимида), что сопровождалось замедлением развития как толерантности, так и физической зависимости. Снижение кругооборота серотонина наблюдалось и при введении налоксона одновременно с повторными дозами морфина. J. K. Ho и соавт. (1972) сообщили, что введение мышам и крысам за 1 сут до вшивания морфиновых таблеток ингибитора синтеза серотонина (*n*-хлорфенилаланина) приводило к частичному замедлению развития толерантности и физической зависимости. Данный эффект проявлялся в виде снижения количества морфина, необходимого для оказания анальгезирующего действия, и увеличения дозы налоксона, необходимого для вызывания состояния абстиненции. Кроме того, *n*-хлорфенилаланин уменьшал потерю массы животного, наблюдаемую при отмене наркотика. Исследование кругооборота серотонина показало, что морфинизированные животные имели более высокий уровень серотонина после введения паргилина, чем нетолерантные, особенно в гипоталамусе и стволе мозга.

Приведенные результаты с использованием *n*-хлорфенилаланина подтвердили данные ранних работ, свидетельствующих о повышении кругооборота серотонина у мышей с развившейся толерантностью к морфину. При имплантации морфиновых таблеток крысам наблюдается увеличение активности триптофангидроксилазы в среднем мозге. Повышение активности фермента обнаружено и в синапсосах, выделенных из перегородки мозга морфинизированных животных. У толерантных мышей наблюдалось увеличение специфической радиоактивности триптофана и серотонина в мозге.

В то же время некоторые исследователи отрицают влияние *n*-хлорфенилаланина на процессы развития толерантности и зависимости. Не наблюдалось изменений в кругообороте серотонина в мозге мышей с физической зависимостью от морфина после ингибирования моноаминооксидазы при помощи транилципомина.

ГАМК-ергические синапсы. Имеется много экспериментальных данных, которые свидетельствуют о вовлечении ГАМК в механизм действия морфина, в частности в его анальгетические эффекты. Так, агонисты ГАМК потенцируют анальгетическую активность морфина у

крыс; также потенцирует аналгетический ответ на морфин введение аминоксуксусной кислоты — ингибитора ГАМК-трансаминазы; одновременное введение с морфином антагониста ГАМК — (бикукуллина) значительно снижает морфинную аналгезию; однократное введение морфина изменяет распределение ГАМК в таламусе, где оканчиваются промежуточные нейроны, участвующие в восприятии боли; налоксон потенцирует активность бикукуллина и обладает антагонистическими свойствами по отношению к ГАМК.

Детальный анализ локальных изменений содержания ГАМК в таламусе и спинном мозге проведен К. Kuriyama и J. Joneida (1978). Однократное введение морфина вызывает значительное повышение содержания медиатора в дорсальных частях задних рогов и в окружении центрального канала спинного мозга, а также в районах вентролатеральных, эндопедункулярных, парафасцикулярных ядер таламуса и интерпедункулярных ядер. Наибольшие изменения наблюдали в окружении вентральных ядер и парафасцикулярных ядрах таламуса, которые, как известно, получают волокна от промежуточных нейронов, участвующих в восприятии боли. Авторы заключают, что имеющее место увеличение концентрации ГАМК в этих областях может быть связано и/или вовлечено в морфинную аналгезию. Возможно, что это происходит в результате изменения функционального состояния ГАМК-содержащих ингибиторных нейронов, которые локализируются и/или оканчиваются в этих таламических ядрах. Подобная точка зрения подтверждается и тем, что изменения в системе ГАМК спинного мозга и таламуса нивелировались предварительным введением наркотического антагониста леваллорфана и не наблюдались при введении ненаркотического аналгетика, например салицилата натрия.

Важной областью для индукции аналгетической активности морфина является околоспинальное серое вещество. Однако исследования К. Kuriyama и J. Joneida (1978) не выявили значимых изменений в содержании ГАМК в данной области при однократном введении морфина, хотя и наблюдали высокий базальный уровень этого медиатора.

Возрастание содержания ГАМК в центральных зонах спинного мозга и в ядрах таламуса сопровождалось параллельным повышением активности глутаматдекар-

боксилазы — с
ГАМК. К. Ку
наблюдаемое
дит не вслед
посредством
Известно, что
гулируется м
соединения, н
кислоты и про
трикарбоновы
морфин оказ
лазную актив

В то же вр
блюдали изме
в гомогенатах
морфина или
средства данн
саль-5-фосфат
содержания Г

Помимо уч
эффектов мор
веденческих п
зывается в ос
нейронов в по

Ф. Moroni
опиатных реце
яла на уровне
или черной су
рота ГАМК в
на и морфина
оборота ГАМК
бледном шаре
ми рецептора
атов приводил
тора.

Наблюдаем
стимуляции оп
ной субстанции.
Введение
мола) также
мя как при в
последняя не
вызываемая о
цепторов ГАМК

боксилазы — фермента, ответственного за образование ГАМК. К. Kuriyama и J. Jopeda (1978) полагают, что наблюдаемое повышение активности фермента происходит не вследствие индукции морфином его синтеза, а посредством изменения его структурных характеристик. Известно, что активность глутаматдекарбоксилазы регулируется многими факторами, такими, как тиоловые соединения, неорганические катионы, некоторые аминокислоты и промежуточные продукты гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Считают, что, вероятнее всего, морфин оказывает воздействие на глутаматдекарбоксилазную активность через подобные факторы.

В то же время J. К. Но и T. Gilliland (1979) не наблюдали изменения активности глутаматдекарбоксилазы в гомогенатах мозга крыс при однократном введении морфина или налоксона *in vitro*, а также изменения сродства данного фермента к его кофактору — пиридоксаль-5-фосфату. Однако авторы не выявили изменения содержания ГАМК под влиянием опиатов.

Помимо участия ГАМК в механизме аналгетических эффектов морфина, он вовлечен в реализацию ряда поведенческих проявлений активности наркотика, что связывается в основном с содержанием ГАМК-ергических нейронов в полосатом теле.

Г. Moroni и соавт. (1968) показали, что активация опиатных рецепторов β -эндорфином и морфином не влияла на уровень ГАМК в хвостатом ядре, бледном шаре или черной субстанции, но изменяла скорость кругооборота ГАМК в этих областях. После введения β -эндорфина и морфина в хвостатом ядре наблюдалось снижение оборота ГАМК, в то время как в черной субстанции и бледном шаре, которые наиболее богаты синаптическими рецепторами, связывающими ГАМК, введение опиатов приводило к повышению кругооборота этого медиатора.

Наблюдаемое повышение кругооборота ГАМК при стимуляции опиатных рецепторов в бледном шаре и черной субстанции коррелировало с появлением каталепсии. Введение в бледный шар агониста ГАМК (мусцимола) также вызывало появление каталепсии, в то время как при введении мусцимола в черную субстанцию последняя не наблюдалась. Тот факт, что каталепсия, вызываемая опиатами, сопровождается стимуляцией рецепторов ГАМК, расположенных в бледном шаре, под-

тверждается экспериментами, в которых наблюдали появление акинетического статуса после инъекции ингибитора ГАМК-трансаминазы — этаноламин-О-сульфата в бледный шар.

Результаты исследований позволили предположить, что короткие аксоны ГАМК-ергических нейронов хвостатого ядра оказывают ингибиторный эффект на длинные аксоны ГАМК-ергических нейронов, выходящих из хвостатого ядра к бледному шару и черной субстанции. Когда опиатные рецепторы в полосатом теле заняты лигандами, это ингибирующее влияние на длинные аксоны снимается, и ГАМК-ергическая активность в бледном шаре и черной субстанции повышается. Показано, что высвобождение ГАМК в дендритах дофаминергических нейронов в черной субстанции ингибирует активность последних. Это в свою очередь может обуславливать специфические поведенческие реакции. Однако, несмотря на многочисленные исследования, детальная межнейронная взаимосвязь в полосатом теле не достаточно ясна. Регуляция дофаминергических нейронов зависит и от транссинаптического высвобождения субстанции Р, глицина и непосредственно энкефалинов.

Данные об изменении функционирования ГАМК-ергической системы при хроническом введении опиатов также противоречивы. Некоторые авторы показали, что фармакологическое манипулирование с системой ГАМК, как, например, снижение распада ГАМК, блокирование рецепторов или ингибирование процесса обратного захвата медиатора, способно влиять на процесс развития толерантности. Повышение концентрации ГАМК в мозге ускоряло развитие толерантности и физической зависимости при имплантации таблеток с морфином. У крыс, толерантных к морфину, повышается уровень ГАМК в субкортикальной и гипоталамической областях.

При продолжительном введении морфина наблюдается снижение как концентрации ГАМК в мозге крыс, так и активности глутаматдекарбоксилазы. Кроме того, уровень накопления ГАМК в мозге у толерантных животных был ниже по сравнению с нетолерантными. Аналогичные результаты были получены J. K. Но и T. Gilliland (1979), которые наблюдали значительное снижение сродства глутаматдекарбоксилазы к пиридоксаль-5-фосфату. Чувствительность фермента к коэнзиму

частично восста-
локсон в дозоз
новлению сродс
саль-5-фосфату.

К. Kugiyama
чимых изменени
мозга и ядрах
мостью от морф
же не наблюда
ГАМК при разв
леваллорфана.
ГАМК, а также
у морфинзависи
положить, что с
на в морфинную

Гистаминерги
венное биологич
го нейромедиато
котиков изучена

Содержание г
и коре не изменя
ших доз морфин
тика на протяже
ным снижением
Преципитировани
ром отмены, вы
тика, приводили
стамина в изуче
и M. B. Roberts
L-гистидин в доз
200 нг при подк
ность и физическ
кие дозы (1500 м
увеличивали тол
морфина, а физи
по снижению ма
налоксоном стер
L-гистидин также
зультаты позволи
определенным об
ности, а его вли
тем подавления п
(1975) приходят

частично восстанавливалась при отмене наркотика. Налоксон в дозозависимой форме способствовал восстановлению сродства глутаматдегидрогеназы к пиридоксаль-5-фосфату.

К. Kuriyama и J. Jonedá (1978) не наблюдали значимых изменений в уровне ГАМК в отделах спинного мозга и ядрах таламуса у крыс с развившейся зависимостью от морфина. У морфинзависимых животных также не наблюдали значимых изменений в содержании ГАМК при развитии синдрома отмены путем введения леваллорфана. Отсутствие изменений в содержании ГАМК, а также в активности глутаматдекарбоксилазы у морфинзависимых животных позволило авторам предположить, что система ГАМК может быть и не вовлечена в морфинную зависимость и/или абстиненцию.

Гистаминергические синапсы. Несмотря на существенное биологическое значение гистамина как вероятного нейромедиатора, его роль в механизме действия наркотиков изучена сравнительно мало.

Содержание гистамина в гипоталамусе, ножках мозга и коре не изменялось после однократной инъекции больших доз морфина, однако хроническое введение наркотика на протяжении 21 дня сопровождалось выраженным снижением концентрации эндогенного гистамина. Преципитированная налоксоном абстиненция или синдром отмены, вызванный прерыванием введения наркотика, приводили к дальнейшему снижению уровня гистамина в изученных областях. По данным С. L. Wong и М. В. Roberts (1975), предшественник L-гистамина — L-гистидин в дозе 500 мг/кг, а также гистамин в дозе 200 нг при подкожном введении не влиял на толерантность и физическую зависимость у мышей. Очень высокие дозы (1500 мг/кг L-гистидина и 300 нг гистамина) увеличивали толерантность к анальгетическим эффектам морфина, а физическая зависимость, о которой судили по снижению массы тела и интенсивности вызываемых налоксоном стереотипических прыжков, подавлялась. L-гистидин также подавляет симптомы отмены. Эти результаты позволили предположить, что гистамин мозга определенным образом вовлечен в развитие толерантности, а его влияние на физическую зависимость осуществляется в противоположном направлении, т. е. путем подавления последней. С. L. Wong и М. В. Roberts (1975) приходят к выводу, что в основе двух феноме-

нов — толерантности и физической зависимости — лежат различные механизмы, но гистамин, по-видимому, связан с обоими процессами. С. L. Wong и M. B. Roberts исследовали также роль H_1 - и H_2 -рецепторов гистамина в механизме действия морфина. Метнамид, антагонист H_2 -рецепторов, ингибировал проявления толерантности, но не оказывал прямого анальгезирующего эффекта и не влиял на анальгетическую активность морфина при его однократном введении. В этой связи авторы заключают, что толерантность к морфину может модулироваться через H_2 -рецепторы. Влияние метнамида на физическую зависимость трудно интерпретировать, однако увеличение интенсивности стереотипических прыжков при вызываемой палоксоном абстиненции позволяет обсуждать и этот вопрос. Мепирамин, блокатор H_1 -рецепторов, не оказывал влияния на толерантность к морфину. Но он вызывал большее снижение массы тела животных по сравнению с контролем при отмене наркотика. Это противоположное влияние L-гистидина и гистамина на физическую зависимость от морфина позволило высказать предположение о возможной роли H_1 -рецепторов в данном процессе. Делая общий вывод, С. L. Wong и M. B. Roberts заключили, что H_2 -рецепторы играют более важную роль в проявлении специфических эффектов при хроническом введении морфина, но нельзя исключать и вовлечение H_1 -рецепторов в механизм действия опиатов.

* * *

Делая общий вывод о влиянии опиатов на нейромедиаторные системы мозга, нельзя не обратить внимания на следующие две характерные особенности: 1) вовлечение в механизм действия опиатов при однократном их введении практически всех известных нейромедиаторных систем и 2) очевидную неоднородность, а порой и противоречивость результатов работ различных авторов, полученных при изучении эффектов опиатов в процессе их хронического введения.

Однократное введение опиатов приводит к увеличению дофаминергической активности в нигростриатных путях, увеличению скорости кругооборота норадреналина, изменению высвобождения ацетилхолина из клеток мозга, увеличению активности нейронов головного и спинного мозга, содержащих серотонин, к активации

ГЛМК-ергичес
Широта набл
диаторных сис
о том, что мо
идентичен эн
дорфинам, я
гуляторами ж
объясняется и
ний активност
веденческих и
века.

При хро
различать рез
рывно получа
после некотор
случае мы им
ческой особен
то время как
Исходя из пр
лирующейся
экстремальном
го биологическ
дят определени
ние сдвига го
При этом в н
механизма за
роксилировании
цифических ан
вяном русле ч
ционирования
мишенями и
бенность проя
ка на организ
защитные свой
клетки на исх
сти, наблюдав
биологически

Именно в
как приспособ
нения своей э
этому не случ
животным опи
чаще всего бл
даемые в неко

ГАМК-ергической системы различных отделов мозга. Широта наблюдаемого спектра изменений в нейромедиаторных системах кажется естественной, если помнить о том, что морфин в своей пространственной структуре идентичен эндогенным пептидам — энкефалинам и эндорфинам, являющимся важнейшими центральными регуляторами жизнедеятельности организма. Именно этим объясняется и многообразие физиологических проявлений активности опиатов — от аналгезии до сложных поведенческих и психических реакций животных и человека.

При хроническом введении опиатов необходимо различать результаты, полученные на животных, непрерывно получавших наркотики, от таковых на животных после некоторого перерыва в наркотизации. В первом случае мы имеем дело с проявлениями такой специфической особенности наркоманий, как толерантность, в то время как во втором — с проявлениями абстиненции. Исходя из представлений об организме как саморегулирующейся живой системе, следует считать, что при экстремальном по продолжительности воздействия любого биологически активного агента в организме происходят определенные изменения, направленные на уменьшение сдвига гомеостаза, вызываемого данным агентом. При этом в настоящее время выделяют три основных механизма защиты организма: увеличение скорости гидроксилирования ксенобиотика в печени, выработка специфических антител, приводящая к связыванию в кровяном русле чужеродного вещества, и изменение функционирования клеток, являющихся для данного вещества мишенями и определяющими в конечном итоге особенность проявления процесса воздействия ксенобиотика на организм. С точки зрения последнего механизма, защитные свойства должны выражаться в возвращении клетки на исходный, нормальный уровень ее активности, наблюдавшийся до начала введения в организм биологически активного вещества.

Именно в этом и заключается смысл толерантности как приспособление клетки к новым условиям для сохранения своей эволюционно выработанной функции. Поэтому не случайно в результате длительного введения животным опиатов специфическая активность нейронов чаще всего близка к нормальным значениям, а наблюдаемые в некоторых случаях расхождения результатов,

полученных различными авторами, скорее всего свидетельствуют о методических различиях в проведенных исследованиях.

О том, что к данному моменту клетка претерпела ряд адаптационных изменений, можно судить по изменениям биохимических параметров ее функционирования при отмене наркотика. Определяемое термином «зависимость» резкое отклонение характеристик функции клетки от нормальных значений свидетельствует о наличии стойких перестроек внутриклеточных регуляторных механизмов. Наблюдаемые эффекты при этом, как правило, прямо противоположны тем, что имеют место при однократном введении опиатов.

Сложившееся в последние годы принципиально новое направление в биологии, задачей которого явились идентификация рецепторов нейропептидов в ЦНС, а также расшифровка функциональной значимости их природных и синтетических лигандов, позволило пересмотреть ранее полученные данные о взаимодействии наркотиков с эндокринной системой организма. В настоящее время исследования в этом плане расширены и дополнены новыми сведениями, касающимися вопросов общности происхождения эндогенных морфиноподобных соединений и тропных гормонов гипофиза, а также их функциональной взаиморегуляции. Большое теоретическое и практическое значение имеют работы, анализирующие механизм позитивных и негативных влияний опиатов и эндогенных морфиноподобных лигандов на синтез и секрецию белковых, пептидных и стероидных гормонов. Совершенствование методических подходов, применяемых для анализа вышеуказанных проблем, а также широкое использование фармакологических и психофармакологических тестов способствуют разработке «функциональных» гипотез, объединяющих под эгидой поведенческих регуляторов как эндокринную, так и нейропептидную систему [Ведерникова Н. Н., Майский А. И., 1981; Бабичев В. Н., Миронов С. Ф., 1981]. В данной главе, помимо конкретных экспериментальных данных, подтверждающих возможность влияния наркотиков и нейропептидов на функцию эндокринной системы, анализируются работы, указывающие на гормоноподобный характер эффектов эндогенных морфиноподобных соединений.

Детальное изучение в эксперименте деятельности андрогензависимых систем в условиях наркотизации обусловлено многочисленными клиническими наблюдениями, указывающими на развитие у наркоманов, потреб-

лявших морфин, героин, метадон и другие наркотики, выраженного снижения фертильности. Выяснилось, что повторное введение опиатов самцам крыс вызывает атрофию половых желез и снижение их секреторной активности. Параллельно наблюдается уменьшение содержания тестостерона лютеинизирующего гормона (ЛГ) в крови, при этом колебаний в количестве фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) не происходит. Эти эффекты наркотиков регистрировались и при их однократном введении. Анализ специфичности влияния наркотиков на концентрацию тестостерона и ЛГ проводился с учетом общепринятых критериев: обратимость найденных изменений под влиянием налоксона, сравнение эффектов биологически активных и неактивных стереоизомеров опиатов, оценка корреляции активности наркотиков, выявленных по данному тесту по сравнению с классическими методами определения их специфического действия. В результате было установлено, что блокада андрогензависимых систем опиатами реализуется через опиатные рецепторы [Cicero T. et al., 1976]. Выраженность ингибирующего влияния опиатных алкалоидов и пептидов на секрецию ЛГ и тестостерона настолько строго соответствует их специфической фармакологической активности, что данное свойство используют в качестве критерия агонистического опиатоподобного действия.

Негативно регулируют функцию гонад и соединения, относящиеся к группе тетрагидроизохинолинов, в частности норлаудансолинкарбоновая кислота (НЛСК), которая имеет выраженное сродство к опиатным рецепторам мозга ($K_{св} = 7,8 \times 10^{-7}$ М). Некоторые аналоги, а именно 3-О-метил- и 3', 4'-дезоксипроизводные НЛСК, в больших количествах образуются в организме людей, страдающих фенилкетонурией, и при лечении больных паркинсонизмом препаратами L-ДОФА [Lasala J. et al., 1980]. Поскольку производные НЛСК являются продуктами конденсации дофамина с 3,4-дигидроксифенилпируватом, необходимо принимать во внимание возможность повышенного образования опиатоподобных соединений с выраженной гипогонадальной активностью во время терапии препаратами L-ДОФА.

Поиск возможного звена, определяющего развитие указанных изменений в цепи гипоталамус — гипофиз — гонады, привел к заключению о первичности поражения

наркотиками би-
тез или высвобо-
ментальным обо-
жило отсутствию
клеточное распр-
же на андроген
множиозитола [с-
шение содержа
20 мг/кг морфин
ет снижению ко
Наиболее весом
ния является от
на у гипofизекто
К сожалению, н
не удалось пол
наркотиков на
данные — отсутс
реднего гипofиз
действием морфи
ного кастрацией
ЛГ в гипofизе п
тельно свидетел
важности данно
1977].

Эффект пода-
деляется не тол-
их к данному и
много выше, чем
ЛГ в сыворотке
ния 0,85 мг/кг м
не вызывает ана
по тесту «горяч
ное гонадотропн
ляется лишь пр
Однократная
крыс, находящих
дотвращает появ
частично снижа
нального статус
При уменьшении
вает негативное
каду овуляции
ных животных.
овуляцию, хотя

наркотиками биохимических систем, регулирующих синтез или высвобождение ЛГ-рилизинг-фактора. Экспериментальным обоснованием подобного заключения послужило отсутствие влияния морфина на включение и субклеточное распределение тестостерона в гонадах, а также на андрогензависимую аккумуляцию в их клетках миоинозитола [Cicero T. et al., 1977]. Более того уменьшение содержания ЛГ при однократном введении 20 мг/кг морфина самцам крыс по времени предшествует снижению количества тестостерона в плазме крови. Наиболее весомым доказательством с нашей точки зрения является отсутствие описываемого эффекта морфина у гипофизэктомированных животных [Cicero T., 1964]. К сожалению, из-за чисто технических трудностей, пока не удалось получить прямых доказательств действия наркотиков на ЛГ-рилизинг-фактор, однако косвенные данные — отсутствие влияния морфина на функцию переднего гипофиза *in vivo* и *in vitro*, уменьшение под действием морфина пика ЛГ в сыворотке крови, вызванного кастрацией, и, наконец, нормальное содержание ЛГ в гипофизе при хронической морфинизации — убедительно свидетельствуют о гипоталамической опосредованности данного действия морфина [Cicero T. et al., 1977].

Эффект подавления морфином продукции ЛГ определяется не только у самцов, однако чувствительность их к данному ингибирующему влиянию наркотика намного выше, чем у самок. Так, у самцов резкое падение ЛГ в сыворотке крови наблюдается уже после введения 0,85 мг/кг морфина. Эта доза настолько мала, что не вызывает анальгезирующего эффекта, регистрируемого по тесту «горячей пластинки». В то же время негативное гонадотропное действие морфина на самок проявляется лишь при введении наркотика в высоких дозах.

Однократная инъекция морфина (60 мг/кг) самкам крыс, находящимся в стадии проэструса, полностью предотвращает появление предовуляционного пика ЛГ и частично снижает выброс ФСГ. Эти изменения гормонального статуса влекут за собой блокаду овуляции. При уменьшении дозы до 20—30 мг/кг наркотик оказывает негативное влияние только на уровень ЛГ, и блокаду овуляции наблюдают лишь у половины подопытных животных. В дозе 10 мг/кг морфин не влияет на овуляцию, хотя и вызывает небольшое, но статистиче-

ски достоверное подавление выброса ЛГ. Налоксон (10 мг/кг) сам по себе не изменяет предвудационное повышение уровня гонадотропных гормонов гипофиза, но блокирует эффект высоких доз морфина и способствует сохранению полноценной овуляции у морфинизированных крыс. Дозозависимый характер действия опиатов и обратимость их эффектов при помощи антагонистов свидетельствуют о специфичности процесса [Pang C. N. et al., 1977].

Пока до конца не ясно, в какой мере угнетающее действие наркотиков на систему гипоталамус — гипофиз связано с фригидностью и импотенцией у людей и нарушением копуляторного поведения у животных. Внутрижелудочковое введение β -эндорфина и устойчивого к ферментативной деградации синтетического аналога мет-энкефалина — [D-ала²]-мет-энкефалинамида — полностью подавляло сексуальное поведение самцов. В этих же дозах [D-ала²]-мет-энкефалин не влиял на спонтанную локомоторную активность животных [Paglietti E. et al., 1978]. Предотвращение подобных негативных влияний налоксоном указывает на участие опиатных рецепторов и эндогенных морфиноподобных соединений в регуляции полового поведения животных. Предполагается, что, помимо вышеуказанных механизмов, огромное значение имеет блокада наркотиками дофаминовых рецепторов, локализованных в медиальном возвышении, которые, как известно, стимулируют копуляторное поведение животных.

На выделение других гормонов передней доли гипофиза — гормона роста (ГР) и пролактина — морфин и его аналоги оказывают стимулирующее влияние. Как известно, скорость выделения ГР отражает баланс между секрецией ГР-рилизинг-фактора (позитивное влияние) и соматостатина (негативное влияние). Учитывая, что морфин не оказывает прямого действия на выделение ГР культурой клеток переднего гипоталамуса, в основе индуцирующего действия опиатов может лежать либо ингибция соматостатина, либо стимуляция выделения ГР-рилизинг-фактора. Кроме того, установлено, что внутривенное введение антисыворотки к соматостатину вызывает быстрое повышение содержания ГР в плазме крови крыс. Используя эту модель, L. Ferland и соавт. (1977) продемонстрировали, что комбинированное введение морфина и его природных аналогов — β -эндорфина

и энкефалинов — в
выделении выделяется
этих эксперимен
роткой, авторы ло
мультируют секрецию
соответствующего
Сравнение эффекти
на на этой же моде
личения содержания
в желудочки мозга
лина. Это наблюде
биологической акти
по другим критери
атов.

Внутрижелудочко
лина в отсутствие
значительное дозоза
причем эффект β -эн
чем у α -эндорфина.
яли на содержание
et al., 1978].

Опиаты стимули
как у intactных, т
крыс, а также у неп
радиолом самок [Ri
эффектом обладают
ные и синтетические
дающее действие по
гораздо сильнее, чем
трексон сами по себе
лактина, а также бло
фина в отношении э
действие морфина на
локсонем, то этот эф
стимулированного л
тина.

Сравнение 19 син
по их способности ин
в плазме крови самц
активные отноше
данным, полученным
Исключение состав
Оме-лей-Оме), сродст
лу сыло гораздо ниже
и Завис № 4089

и энкефалинов — ведет к аддитивному эффекту в отношении выделения ГР. Так как соматостатин в условиях этих экспериментов был нейтрализован антисывороткой, авторы логично предположили, что опиаты стимулируют секрецию ГР опосредованно через выделение соответствующего рилизинг-фактора гипоталамуса. Сравнение эффективности β -эндорфина и мет-энкефалина на этой же модели показало, что для 6-кратного увеличения содержания ГР в плазме необходимо ввести в желудочки мозга 2 мг эндорфина или 40 мг энкефалина. Это наблюдение согласуется с более высокой биологической активностью β -эндорфина, измеренной по другим критериям специфического действия опиатов.

Внутрижелудочковое введение эндорфинов и энкефалина в отсутствие антител к соматостатину вызывает значительное дозозависимое повышение в плазме ГР, причем эффект β -эндорфина выражен намного сильнее, чем у α -эндорфина. Лей- и мет-энкефалины слабо влияли на содержание ГР в плазме крови крыс [Kato Y. et al., 1978].

Опиаты стимулируют секрецию пролактина *in vivo* как у intactных, так и у стероиддефицитных самцов крыс, а также у неполовозрелых и индуцированных эстрадиолом самок [Rivier C. et al., 1977]. Аналогичным эффектом обладают α - и β -эндорфины, а также природные и синтетические энкефалины, причем их высвобождающее действие по отношению к пролактину выражено гораздо сильнее, чем в случае с ГР. Налоксон и налтрексон сами по себе снижают базальный уровень пролактина, а также блокируют индуцирующий эффект морфина в отношении этого гормона. Интересно, что если действие морфина на ГР и пролактин блокируется налоксоном, то этот эффект не наблюдается в отношении стимулированного лей-энкефалином выброса пролактина.

Сравнение 19 синтетических аналогов энкефалинов по их способности индуцировать содержание пролактина в плазме крови самцов крыс показало, что структурно-активные отношения по этому тесту соответствуют данным, полученным на модели с опиатным рецептором. Исключение составил лишь пептид (тир-гли-гли-тир-Оме-лей-Оме), сродство которого к опиатному рецептору было гораздо ниже стандартной величины ($K_{св.} = 5 \times$

$\times 10^{-5}$ М), а действие на пролактин выявлялось при концентрации 10^{-9} М. Ферментативно устойчивые аналоги мет-энкефалина — [D-ала²]-мет-энкефалин и [D-ала²]-мет-энкефалинамид — оказывали в 500 и 5000 раз соответственно более выраженное действие, чем естественный пентапептид [Cusan L. et al., 1977]. Кроме того, показана важность L-тирозинового остатка для проявления исследуемой биологической активности данного ряда пептидов.

Все эффекты энкефалинов, выявленные в экспериментах на грызунах, были воспроизведены при изучении действия синтетического аналога мет-энкефалина на мужчинах-добровольцах, у которых он повышал содержание пролактина, соматотропина, но снижал уровень ЛГ и ФСГ, что свидетельствует об определенной универсальности регулирующего действия эндогенных МПС на состояние гипоталамо-гипофизарной системы у животных и человека [Stubbs W. A. et al., 1978]. Однако, анализируя вышеприведенные данные, следует подчеркнуть, что действие опиатов и их эндогенных аналогов не во всех случаях опосредуется через опиатные рецепторы. Так, отсутствие блокирующего эффекта налоксона на стимуляцию морфином и энкефалинами пролактина было отмечено в опытах на козлах.

В данном контексте уместно упомянуть о гипотезе L. Ferland (1977), объясняющей стимуляцию пролактина эндо- и экзогенными опиатами ингибированием выхода дофамина из пресинаптических окончаний в медиальном возвышении мозга. Это предположение согласуется с данными D. A. VanVugt и соавт. (1979), показавшими, что введение L-ДОФА (предшественника дофамина), пирибедила (агониста дофамина) или аминэптина (ингибитора реутилизации дофамина) в каждом отдельном случае вызывает понижение концентрации пролактина в сыворотке. Галоперидол, напротив, повышает уровень этого гормона. L-ДОФА и пирибедил предотвращают стимулирующий эффект морфина в отношении пролактина, повышая при этом активность дофамина. Морфин блокирует ингибирующий эффект аминэптина, возможно, путем понижения им количества дофамина, способного реабсорбироваться.

Введение субпороговых доз галоперидола в сочетании с субпороговыми дозами морфина приводит к повышению уровня пролактина в плазме крови, по-видимо-

му, суммируя их
ческие нейроны.
превращения до
после введения
путь действитель
ющего действия
Эффект опиа
доли гипофиза л
действием с реце
β-эндорфин, ин
ностью антагониз
дола — антагонис
него гипофиза б
Небольшая конку
морфина (IC_{50} р
1979]. В этой св
[H]-спироперидол
торам дофамина;
ют собой лишь ко
центров этого н
(1979), не опровер
ют, что опиаты мо
рующих клеток ги
авторы обосновыв
согласно которым
тающее действие д
пофизом. Так, инги
в этой модельной
ставляет 55%, а пр
жается до 7%.
О том, что суще
в который не вовл
свидетельствуют да
ские агонисты (пи
ингибируют выделе
ем опиатов. При э
пина не опосредует
роны, так как блок
катехоламинов не
может быть нивели
K. T. et al., 1979]. Т
действия опиатов на
ра невыясненным, о

му, суммируя ингибирующее действие на дофаминергические нейроны. Непосредственное измерение скорости превращения дофамина в медиальном возвышении крыс после введения опионидных пептидов показало, что этот путь действительно лежит в основе пролактининдуцирующего действия наркотиков.

Эффект опиатов на выделение гормонов из передней доли гипофиза логично объяснить их прямым взаимодействием с рецепторами нейромедиаторов. Однако ни β -эндорфин, ни лей-энкефалин не обладают способностью антагонизировать связыванию [3 H]-спироперида — антагониста дофамина ни с мембранами переднего гипофиза быка, ни в полосатом теле мозга крыс. Небольшая конкурентная активность выявлена лишь у морфина (IC_{50} равна 0,5 мМ) [Meltzer H. Y., So R., 1979]. В этой связи встает вопрос об идентичности [3 H]-спироперидолсвязывающих мест истинным рецепторам дофамина; не исключено, что первые представляют собой лишь компонент гетерогенной популяции рецепторов этого нейромедиатора H. Enjalbert и соавт. (1979), не опровергая гипотезы L. Ferland, предполагают, что опиаты модулируют реакцию пролактинсекретирующих клеток гипофиза на дофамин. Свой постулат авторы обосновывают экспериментальными данными, согласно которым морфин *in vitro* предотвращает угнетающее действие дофамина на секрецию пролактина гипофизом. Так, ингибция дофамином выделения гормона в этой модельной системе в отсутствие наркотика составляет 55%, а при добавлении 10^{-6} М алкалонда снижается до 7%.

О том, что существует механизм действия морфина, в который не вовлекается дофаминергическая система, свидетельствуют данные, согласно которым холинергические агонисты (пилокарпин, физостигмин и никотин) ингибируют выделение пролактина, вызванное введением опиатов. При этом подавляющий эффект пилокарпина не опосредуется через катехоламинергические нейроны, так как блокада дофамина или резкое снижение катехоламинов не предотвращают негативное влияние холинергического препарата. В то же время этот эффект может быть нивелирован введением атропина [Migaki T. et al., 1979]. Таким образом, конкретный уровень действия опиатов на секрецию пролактина остается пока невыясненным, однако не исключается возможность

«двойной реализации» данного феномена: через дофаминергические и холинергические нейроны.

Выраженное влияние оказывает морфин и на функцию промежуточной доли гипофиза. Классический антидиуретический эффект морфина обусловлен, как выяснилось в последние годы, выбросом в кровяное русло вазопрессина и может быть устранен введением антител к этому гормону [Kanjanapothi D., 1975]. Важно отметить, что существуют данные о прямой стимуляции морфином нейросекреторных клеток при инъекции наркотика в супраоптическое ядро гипоталамуса [Duke H. et al., 1951]. Внутривенное введение метаболически стабильных аналогов лей-энкефалина и β -эндорфина вызывает у крыс и кроликов антидиуретический эффект, блокируемый налоксоном. Данный феномен ассоциируется с повышением экскреции вазопрессина с мочой. Несмотря на то что в мембранах промежуточной и задней долей гипофиза имеются опиатные рецепторы, β -эндорфин не оказывает прямого влияния на выделение вазопрессина клетками изолированной промежуточной доли *in vitro*, что исключает гипофизарный уровень действия наркотиков. Очевидно, в данном случае первичной точкой приложения опиатов можно считать супраоптические и паравентрикулярные ядра переднего гипоталамуса.

Кроме вышеперечисленных пептидных гормонов, опиаты обладают способностью снижать уровень инсулина у собак и козлов [Konturek S., 1978]. В последнем случае эффект частично обращается налоксоном. Эти данные наряду с присутствием энкефалиноподобной иммунореактивности в клетках поджелудочной железы позволяют предположить участие системы энкефалины — опиатный рецептор в физиологической регуляции функции поджелудочной железы.

Однократное и хроническое введение морфина крысам приводит к резкому снижению содержания тиреотропного гормона гипофиза (ТТГ), параллельно уменьшается как поглощение, так и выделение ^{131}I щитовидной железой. Непосредственного негативного влияния на щитовидную железу морфин не оказывает, как введение экзогенного ТТГ адекватно стимулирует выделение ^{131}I у крыс, предварительно получавших опиаты [George R., Lomax P., 1965]. Ингибирующее действие морфина на функцию щитовидной железы связано с влиянием наркотика на гипоталамическую область. Это

было установлено в экспериментах с билатеральным электрическим повреждением медиальных ядер сосцевидного тела гипоталамуса, которое устраняло тиреотропное влияние морфина. Эффект опиатов в отношении системы ТТГ — щитовидная железа, таким образом, связан с блокадой выделения соответствующего рилизинг-фактора (TRH) в гипоталамусе. Это объясняет и увеличение чувствительности клеток гипофиза к экзогенному TRH у мышей, предварительно получавших опиаты [Redding T. W. et al., 1966].

Действие однократного введения морфина на АКТГ выражается в снижении содержания этого пептида в сыворотке крови и непосредственно в гипофизе [Westermann E. O. et al., 1962]. Разрушение медиального возвышения нивелирует негативный эффект морфина в отношении АКТГ, что указывает на гипоталамический уровень поражения опиатами адrenокортикотропной функции.

Таким образом, следует отметить, что опиаты, влияя практически на все гипофизарные гормоны, осуществляют свое действие через гипоталамическую область, позитивно или негативно регулируя синтез соответствующих рилизинг-факторов.

Необходимо выделить существование иных механизмов, посредством которых наркотики, не относящиеся к классу опиатов, могут воздействовать на систему гипоталамус — гипофиз — гонады. Известно, например, что у больных хроническим алкоголизмом снижена потенция, нарушен сперматогенез, имеется атрофия яичек. Однако между клиническими проявлениями гипогонадизма у подобных пациентов и концентрацией тропных гормонов гипофиза корреляции не найдено. Эндокринологическое обследование больных хроническим алкоголизмом позволило установить небольшое снижение содержания тестостерона в сыворотке крови у части пациентов (при нормальном уровне у других) и повышенное в ряде случаев или нормальное содержание ФСГ, ЛГ и пролактина. Более того удалось показать, что повреждение гонад в условиях длительного приема этанола не связано с цирротическим поражением печени и изменением метаболизма гормонов. Один из наиболее возможных этиологических факторов воздействия этанола на репродуктивные органы описан V. K. Bhalla и соавт. (1979), которым удалось установить, что в водно-спир-

товых экстрактах ткани яичек крыс содержатся вещества, связывающие ЛГ и ФСГ с высоким сродством и специфичностью. По-видимому, этанол обладает повреждающим мембранотропным действием, способствующим солюбилизации рецепторов ЛГ и ФСГ в яичках и обуславливающим уменьшение стероидогенеза в этом органе. Эти факты не исключают возможности прямого действия этанола на гипофиз и гипоталамус. Подтверждением тому служат данные, согласно которым острая интоксикация этанолом у здоровых людей тормозит реакцию ЛГ на введение ЛГ-рилизинг гормона [Van Tiel D. H. et al., 1978].

Наряду с работами, указывающими на координирующее действие эндогенных морфинов в отношении секреторной функции гипоталамуса и гипофиза, имеются многочисленные экспериментальные подтверждения влияния пептидных гормонов и рилизинг-факторов на специфическую эффективность эндогенных опиатов в организме. Система гипофиз — надпочечники оказывает большое влияние и на добровольное потребление морфина крысами. Так, гипофизэктомия и адреналэктомия угнетают потребление морфина, а введение АКТГ восстанавливает его до исходного уровня [Van Ree J. M., Niesing P. J., 1978].

Возможность моделирования стадий экспериментальной опиомании при помощи природного нейропептида (фактора, ингибирующего выделение меланоцитстимулирующего гормона — МИФ) и его синтетических аналогов доказана R. Walter и соавт. (1979). Трехдневное введение этих пептидов мышам с имплантированными таблетками морфина блокирует развитие толерантности и физической зависимости.

В то же время МИФ и его аналоги не влияют на обезболивающее действие морфина. Предполагая опосредованность действия дериватов МИФ через дофаминергическую систему, авторы тем не менее не выявили четкой корреляции между эффективностью препаратов в предотвращении наркотических свойств морфина и их влиянием на дофаминергическую передачу нервного импульса в экстрапирамидной системе. Несмотря на некоторую неясность в отношении механизмов специфического феномена МИФ и его дериватов, следует иметь в виду перспективность совместного введения данных пептидов с опиатными анальгетиками для «вычленения» се-

активного обезбо-
лительной нар-
Аналог вазо-
прессии), напр-
к анальгезирующе-
экспериментах на-
син и окситоци-
витис у крыс физ-
Ree J. M., De W-
врожденное пред-
но отобранных и-
ски обусловленные
гинин-вазопрессин
1977].

Рилизинг-горм-
личные эффекты
лизинг-фактор (Т-
ГР и пролактина-
стоящее время ус-
зировать снижени-
каталепсии у кры-
day J. et al., 1978
ющее действие оп-
β-эндорфина и н-
что ясно демонст-
функции гипофиза.

Помимо опиат-
тагонизирует седа-
барбитуратов, ал-
Этот рилизинг-гор-
ность как при ви-
брюшинном спосо-
имеется убедител-
свойства TRH. То-
низм его действи-
сти от того, в ка-
аналептик?). Так-
мость гормональн-
рилизинг-фактора

Как следует из-
тивные взаимодей-
ципу обратной св-
опиатов, а также
гипофизарные гор-

лективного обезболивающего действия при снижении нежелательной наркогенной активности опиатов.

Аналог вазопрессина (дезглицинамид⁹-лизин-вазопрессин), напротив, облегчает развитие толерантности к анальгезирующему эффекту морфина, что показано в экспериментах на мышах. Другие производные вазопрессина и окситоцин обладают способностью ускорять развитие у крыс физической зависимости от морфина [Van Ree J. M., De Wied D., 1976]. Имеются данные, что врожденное предпочтение к алкоголю у крыс, селективно отобранных по этому признаку, связано с генетически обусловленным повышенным уровнем секреции аргинин-вазопрессина у этих животных [Linkolla G. et al., 1977].

Рилизинг-гормоны также могут изменять самые различные эффекты опиатов. В частности, тиреотропин-релизинг-фактор (TRH) блокирует стимуляцию выделения ГР и пролактина, вызванные введением морфина. В настоящее время установлена способность TRH антагонизировать снижению моторной активности, гипотермии и каталепсии у крыс после введения β -эндорфина [Holaday J. et al., 1978]. Однако он не влияет на обезболивающее действие опиатов; TRH действует как антагонист β -эндорфина и на гипофизэктомированных животных, что ясно демонстрирует независимость его действия от функции гипофиза и щитовидной железы.

Помимо опиатных алкалоидов и пептидов, TRH антагонизирует седативному и гипотермическому действию барбитуратов, алкоголя и других депрессантов ЦНС. Этот рилизинг-гормон проявляет аналептическую активность как при внутрицистернальном, так и при внутрибрюшинном способе введения. К сожалению, пока не имеется убедительных гипотез, объясняющих необычные свойства TRH. Тем не менее предполагают, что механизм его действия принципиально отличен в зависимости от того, в какой роли выступает TRH (гормон или аналептик?). Таким образом, постулируется независимость гормонального и поведенческого эффектов этого рилизинг-фактора [Bisset G. W. et al., 1978].

Как следует из вышеизложенного, сложные ассоциативные взаимодействия с элементами регуляции по принципу обратной связи объединяют систему эндогенных опиатов, а также других нейропептидов и гипоталамо-гипофизарные гормоны. Энкефалины и эндорфины, по-

мимо модуляции болевой реакции организма, выполняют важнейшую роль в опосредовании большинства поведенческих реакций, возможно, именно благодаря своему влиянию на эндокринную систему. Наличие эффектов эндогенных морфиноподобных соединений, не связанных непосредственно с опиатными рецепторами, указывает на координирующее действие этих соединений, возможно, путем прямого влияния на нейромедиаторы. Ввиду этого становится очевидной связь между рецепцией, раздражением, поведением и нейроэндокринной регуляцией высвобождения гормонов.

Тот факт, что эндогенные морфиноподобные пептиды имеют общие предшественники с АКТГ и β -ЛТГ (см. главу 2), является еще одним подтверждением тесной генетической связи эндогенных пептидов с гормонами гипофиза.

Наличие общих аминокислотных последовательностей в молекулах эндогенных морфиноподобных соединений и АКТГ, меланотропина, β -ЛТГ явилось стимулом для исследования пептидных гормонов на опиатоподобную активность, тем более что ранее была показана возможность взаимодействия АКТГ₁₋₃₉, АКТГ₁₋₂₄ и α -МСГ с морфином на уровне спинальных рефлексов. L. Terenius и соавт. (1975) удалось показать сродство некоторых пептидных гормонов к опиатным рецепторам ЦНС крысы по ингибированию этими пептидами стереоспецифического связывания [³H]-дигидроморфина и [³H]-налтрексона с синаптосомальной фракцией мозга. Среди большого количества пептидов и свободных аминокислот только синтетический фрагмент N-терминального конца АКТГ₁₋₂₈ и АКТГ₄₋₁₀, а также соматостатин обладали сродством к опиатным рецепторам (IC_{50} было равно 10^{-6} — 10^{-5} М). Оказалось, что последовательность АКТГ₄₋₁₀, являясь общей для кортикотропина, меланотропина и β -ЛТГ, обеспечивает биологическую активность последних в нескольких функционально не связанных системах — адреналовой, опиатной рецепторной и поведенческой регуляции ЦНС.

Уменьшение фрагмента 4—10 до 4—7, 4—9, а также увеличение до 5—10 и 7—10 приводило к падению конкурентноспособности, что обнаружено в радиорецепторных исследованиях. N-терминальная элонгация этой последовательности до 1—10 не влияла на сродство к рецептору. Дальнейшее увеличение числа аминокислот

(1—13) снижало. Следует отметить, что в опытах с наличием АКТГ, а именно опыты с новыми подтвердили это. Сходства как в опытах первых по 1976].

Как известно, свойства опиатных фиксируются по присутствию ионных каналов. Показано, что в соматостатине очень низка, т. е. низка, так и антиопиатные хорошо объясняют действия, выявляющие АКТГ антагонизм. Типам, индуцированным [1975]. Можно все соматостатин на стимуляцию. По-видимому, эти химическими свойствами.

С другой стороны, АКТГ, так и морфин, реакции „grooming“ поведенческая антиопиатных сводит к минимуму, несмотря на небольшие возможности в областях фрагментов, необходимых для нейроны, необходимыми или позитивными эндогенными опиоидными метаболитами. Весьма интересно, что между системой гормонов и системой регуляции. С одной стороны, соединения влияют.

(1—13) снижало опиатоподобные свойства полипептидов. Следует отметить, что в более ранних работах упоминается о наличии второго активного центра в молекуле АКТГ, а именно фрагмента 11—24. Однако дальнейшие опыты с новыми порциями синтетического пептида не подтвердили этого вывода. Авторы трактуют данные расхождения как результат недостаточной химической чистоты первых порций препарата [Gispen W. H. et al., 1976].

Как известно, агонистические или антагонистические свойства опиатов в радиорецепторных исследованиях фиксируются по изменению комплексообразования в присутствии ионов натрия. Используя этот метод, удалось показать, что селективность опиатоподобного действия соматостатина и некоторых фрагментов АКТГ очень низка, т. е. они в равной мере ведут себя как агонисты, так и антагонисты. Налорфиноподобное поведение хорошо объясняет двойственность их биологического действия, выявляемая в опытах *in vivo*. Так, аналоги АКТГ антагонизируют некоторым поведенческим стереотипам, индуцированным морфином [Gispen W. H. et al., 1975]. Можно вспомнить и о негативном влиянии соматостатина на стимулируемый морфином выброс ГР. По-видимому, эти эффекты обусловлены антагонистическими свойствами АКТГ и его фрагментов.

С другой стороны, внутрижелудочковое введение как АКТГ, так и морфина вызывает у животных появление реакции „grooming“ (приведение себя в порядок). Эта поведенческая аналогия, вероятно, является следствием агонистических свойств молекулы АКТГ. Таким образом, несмотря на небольшую $K_{св.}$, равную 10^{-5} — 10^{-6} М, учитывая возможность довольно высокой концентрации определенных фрагментов молекул АКТГ, β -ЛПГ и α -МСГ в областях мозга, содержащих энкефалинергические нейроны, необходимо иметь в виду возможность негативной или позитивной модуляции эффективности действия эндогенных опиоидов пептидными гормонами и продуктами их метаболического распада.

Весьма интересные взаимоотношения складываются между системой стероидной адаптации организма (половые гормоны и кортикостероиды) и нейропептидной системой регуляции поведения, боли, эмоций и т. д.

С одной стороны, эндогенные морфиноподобные соединения влияют на периферический стероидогенез через

убедительно подтверждают наше мнение, согласно которому, несмотря на некоторую автономность, две важнейшие адаптационные системы организма функционируют взаимозависимо. Общность между опиатами и стероидами не вызывает сомнения. Как те, так и другие являются производными пергидрофенантрена, могут вызывать эйфорию, аналгезию, седацию, гипо- и гипертермию, конвульсии, респираторную депрессию, и другие эффекты [La Bella F., 1975]. Как опиаты, так и стероиды осуществляют свой эффект через взаимодействие с соответствующими специфическими рецепторами, и хотя для биологически активных стероидов не показана возможность конкуренции за опиатные рецепторы, высокая конкурентная способность выявлена у α -эстранов — гормонально-неактивных стереоизомеров эстрогенов [La Bella F. et al., 1978].

Характерно, что конкурентные кривые для этих стероидов, построенные в координатах Скетчарда, параллельны таковым для морфина и налоксона. Очень активно вытесняет [^3H]-налоксон из комплекса с опиатным рецептором полусинтетический стероид с опиатоподобным действием ЗС 22000. Наибольшую эффективность в радиорецепторных исследованиях с [^3H]-налоксоном проявил 17α -дигидроэквилин (IC_{50} 1 мМ), менее активен в конкурентном отношении — 17α -эстрадиол (IC_{50} 3 мМ), промежуточная активность выявлена у 17α -дигидроэквилина (IC_{50} 1,8 мМ).

Конкурентная активность α -эстранов очень высока. Сродство дигидроэквилина к опиатному рецептору сравнимо с мет-энкефалином, в 3 раза превышает эффективность лей-энкефалина по этому тесту и составляет $1/3$ активности морфина. Поведение дигидроэквилина в присутствии Na^+ и Mn^{2+} позволяет отнести его к группе антагонистов опиатов. Таким же эффектом обладает и 17α -дигидроэквилин. В то же время полусинтетический стероид ЗС 22000 в условиях данной модели ведет себя как чистый агонист. По-видимому, 17α -эстрадиол можно рассматривать как препарат со смешанными агонист-антагонистическими свойствами. Способность α -эстранов взаимодействовать с опиатными рецепторами определяет, очевидно, их аналгезирующее действие при систематическом введении мышам. Опиатоподобное действие 17α -эстранов высокоспецифично, так как 17β -аналоги не обладают подобным влиянием.

Некоторые другие модификации стероидной молекулы, а именно замещение фенольных 3-ОН или 17-ОН групп лишает 17 α -эстраны их опиатоподобной активности.

Что касается возможности наркотиков изменять связывание гормонов с определенными фракциями клетки и с гормональными рецепторами, то по этому вопросу имеются многочисленные, но противоречивые данные. Высокая конкурентная способность как агонистов, так и антагонистов наркотиков по отношению к связыванию [^3H]-тестостерона с микросомальной фракцией печени описана F. La Bella (1975).

В связи с тем что не было найдено корреляции между сродством соответствующих опиатов к специфическим рецепторам и их активностью в качестве конкурентов [^3H]-тестостерона, специфический механизм действия в данном случае исключается. Логичнее всего предположить, что выявленные эффекты являются отражением конкуренции субстратов (опиатов и стероидов) за связывание с активными центрами цитохрома Р-450, осуществляющих метаболизм данных соединений.

Возможность взаимодействия наркотиков со стероидами на уровне транспортных цитоплазматических белков печени изучалась в нашей лаборатории по конкуренции барбитуратов за специфические рецепторы эстрадиола. Использование метода конкурентного белкового связывания с разделением свободной и связанной формы [^3H]-эстрадиола на декстранпокрытом угле позволило установить, что барбитураты обладают способностью вытеснять гормон из его комплекса с цитоплазматическими рецепторами печени [Ведерникова Н. И. и др., 1979]. Оказалось, что конкурентная активность производных барбитуровой кислоты, особенно фенobarбитала и этаминала, существенно превосходит таковую у тестостерона и прогестерона в условиях вышеописанной модели. В то же время барбитураты в аналогичных концентрациях не влияли на связывание [^3H]-эстрадиола в органах-мишенях и в мозге, а также не изменяли параметров ассоциации [^3H]-дексаметазона со специфическими рецепторами ни в одном из органов крыс, включая и печень. Уникальность эффекта сродства барбитуратов к цитоплазматическим рецепторам эстрадиола в печени предполагает, что он обусловлен общностью

метаболических систем, трансформирующих как гормоны, так и наркотики.

Насыщенность организма стероидными гормонами, в особенности половыми, влияет на проявление снотворного и токсического действия барбитуратов, изменяет выраженность ответной реакции организма на алкоголь. Более того стероидный гормональный фон во многом определяет и скорость развития экспериментального алкоголизма.

Установлено, что половые различия влияют на процесс формирования предпочтения 8% этанола воде (в условиях свободного выбора), который быстрее протекает у самцов крыс. Однако степень предпочтения сильнее выражена у самок. При повторном предоставлении этанола после его отмены восстановление «предпочтения» алкоголя происходило быстрее у самок и было более выражено, чем у самцов [Андропова Л. М., Барков Н. К., 1978]. Тестостерон в противоположность эстрадиолу и прогестерону ускоряет процесс развития предпочтения этанола у кастрированных самцов крыс, и это свойство гормона зависит от андрогенного, но не анаболического компонента его действия [Lakoza L., Barkov N., 1980]. Высказано предположение, что андрогены, по-видимому, являются эволюционно более молодыми регуляторами клеточного метаболизма, и при хроническом воздействии наркотиков и алкоголя в первую очередь происходит нарушение именно тестостеронзависимых ферментных систем, окисляющих наркотики, и лишь затем страдают эстрогензависимые системы. Различия в скорости и выраженности повреждения гормонзависимых систем у особей разного пола определяются циклическим и ациклическим пиком гипоталамической регуляции [Андропова Л. М., Барков Н. К., 1981].

Изучение анальгезирующего действия морфина у адреналэктомированных и кастрированных самцов крыс показало, что эффект наркотика проявляется у животных с удаленными надпочечниками, но оно практически не обнаруживается у адреналорхидэктомированных крыс. Очевидно, мобилизация эндогенных половых стероидов при стрессе уменьшает интенсивность восприятия болевого стимула, и данный эффект потенцируется введением морфина [Pinski S. et al., 1975]. Антагонист морфина — налоксон — увеличивает болевую чувствительность адреналэктомированных, и ложноадренал- и

гипофизэктомированных животных, но не оказывает влияния на гипофизэктомированных мышей [Grevert P. et al., 1978].

В пользу гипотезы об участии эндогенных стероидов в реализации эффектов наркотиков свидетельствуют наблюдения, согласно которым внутримозговое введение некоторых стероидов, особенно андростеронсульфата, вызывает поведенческие и электроэнцефалографические изменения, идентичные таковым при введении морфина и эндорфина, причем действие стероидов блокируется налоксоном. При сравнении эффектов сульфатов стероидов, неконъюгированных стероидов и нестероидных сульфатов, а также глюкуронидов и фосфатов стероидов также была выявлена специфичность сульфатных производных гормонов в формировании опиатоподобных реакций [La Bella F. et al., 1979]. Авторы расценивают полученные данные как доказательство роли экстрацеллюлярных ионов (Ca^{2+} и SO_4^{2-}), отщепляющихся от циркулирующих стероидов, в обеспечении функционирования опиатных рецепторов.

Однако, с нашей точки зрения, такое объяснение механизма стероид-опиатной связи не может претендовать на универсальность. Безусловно, ионы стероидного происхождения могут поддерживать тот или иной «тонус» опиатных рецепторов, однако трудно предположить, что они играют центральную роль в координационной связи двух адаптационных систем организма.

При сравнительном анализе механизма действия гормонов и эндогенных морфиноподобных соединений со всей очевидностью выступает общность эффекторных механизмов реализации их специфического действия. Действительно, мембранные рецепторы ЦНС для гормонов и эндогенных морфиноподобных пептидов достаточно селективны и стереоспецифичность их взаимодействия с соответствующими механизмами не вызывает сомнения. С другой стороны, в обоих случаях непосредственный эффект зачастую передается при помощи «универсального посредника» — цАМФ. Значение этого циклического нуклеотида весьма велико не только для воспроизведения непосредственного ответа на однократное действие определенного стимула (гормона, энкефалина, эндорфина), но приобретает большую патогенетическую значимость при хроническом введении опиатов, т. е. при развитии состояния зависимости от наркотика.

Базируясь (1979), используя турей гибридных основал гипотезу зависимости от болизма цАМФ введение цАМФ томы «отмены» Аналогичный 3-изобутил-1-м зы, метаболизм феномен полу cis D. L. et al.

В последние ют внимание цАМФ — цГМ ских нуклеоти ской деградац роль биологич морфинов. Д S. V. Childer показать, что регулируется ГДФ.

Очевидно, ииновых и а сальным посл пептидные, ст тивные нейро

Условности системы очев тельности энд узкоспецифич связь (структ ными морфин ляции адапта и т. д. В свою динин и β -энд тируются зате гормонами.

Если фун гать, то физи мере частичн и клинически

Базируясь на этих предпосылках, S. H. Snyder (1979), используя данные, полученные в опытах с культурой гибридных клеток из нейробластомы и глкомы, обосновал гипотезу развития толерантности и физической зависимости от опиатов как следствие нарушения метаболизма цАМФ. Действительно, внутрижелудочковое введение цАМФ в эксперименте вызывает многие симптомы «отмены» опиатов.

Аналогичный эффект наблюдается при введении 3-изобутил-1-метилксантина, ингибитора фосфодиэстеразы, метаболизирующий цАМФ. Этот фармакологический феномен получил название «вази-абстиненция» [Francis D. L. et al., 1975].

В последнее время исследователи также акцентируют внимание на значимости негативного регулятора цАМФ — цГМФ. Более того, предшественники циклических нуклеотидов, а также продукты их метаболической деградациии, по-видимому, могут обеспечивать контроль биологической эффективности эндо- и экзогенных морфинов. Доказательством тому служат данные S. V. Childer и S. H. Snyder (1978), которым удалось показать, что стереоспецифическое связывание опиатов регулируется гуаниновыми нуклеотидами — ГТФ и ГДФ.

Очевидно, система циклических и нециклических гуаниновых и адениновых нуклеотидов является универсальным посредником, связывающим в единую цепь пептидные, стероидные гормоны и эндогенные психоактивные нейропептиды.

Условность разделения этих систем на две различные системы очевидна: не отрицая относительной самостоятельности эндокринного статуса организма в регуляции узкоспецифических функций, доказана тесная взаимосвязь (структурно-функциональная аналогия) с эндогенными морфиноподобными пептидами в отношении корреляции адаптационных процессов организма, поведения и т. д. В свою очередь опиатоподобные соединения (анодинин и β -эндорфин), синтезируемые в гипофизе, инкретируются затем в кровяное русло, фактически являются гормонами.

Если функцию анодинина можно только предполагать, то физиологическая роль β -эндорфина по крайней мере частично уже подтверждена экспериментальными и клиническими данными.

Спорный вопрос о существовании или отсутствии базального фона β -эндорфина в крови здоровых людей решен в настоящее время положительно. Более того, оказалось, что этот морфиноподобный пептид выделяется одновременно с АКТГ в ответ на стресс, и пик в плазме β -эндорфина сопутствует тем эндокринным заболеваниям, для которых характерен повышенный уровень АКТГ (болезнь Аддисона, Кушинга, синдром Нельсона) [Hölli V. et al., 1979]. У животных нарастание β -эндорфина в крови сопровождается выбросом АКТГ, индуцированный действием стрессорных агентов, адrenaлэктомии и метапирона. Трофическая функция β -эндорфина, выступающего в качестве периферического гормона, отчетливо проявляется при изучении его влияния на активность орнитиндекарбоксилазы. В диапазоне концентраций от 4 до 400 мкг/кг β -эндорфин не изменяет активность орнитиндекарбоксилазы у самок крыс в надпочечниках, сердце, печени, тимусе и других органах. Селективный эффект стимуляции данного фермента был показан только в отношении почек. Гипофизэктомия, устраняя возможность синтеза β -эндорфина, приводила к резкому уменьшению активности орнитиндекарбоксилазы, а введение пептида в этих условиях в течение нескольких часов вызывало характерную индукцию фермента. О специфичности данного эффекта свидетельствует обратимость его налоксонем. Способность эндогенных морфиноподобных соединений, циркулирующих в крови, регулировать функцию почек, по-видимому, является одним из моментов, способствующих поддержанию артериального кровяного давления и купированию патофизиологических проявлений шока [Haddock M. H., Russel D. H., 1979].

Только интимная взаимосвязь нейропептидов с нейромедиаторной системой, с одной стороны, и эндокринной системы — с другой, позволяет осуществить быструю и лабильную регуляцию поведения, эмоциональной сферы, болевой и температурной чувствительности и, таким образом, адаптировать организм к меняющимся условиям окружающей среды. По-видимому, периферические и центральные функции эндогенных морфиноподобных соединений сугубо различны. И если первые годы после открытия эндогенных лигандов опиатных рецепторов интерес исследователей был сосредоточен на центральных их свойствах (действие на ЦНС), то в настоящее

время сформировавшиеся и трактуемые (см. главы) периферические морфиноподобные традиционно в аторной системе прогрессируют в изнурительных и психических о высшей и

время сформировалось целое направление, изучающее и трактуемое периферическое действие нейропептидов (см. главу 2). Выяснение соотношений центральных и периферических эффектов в действии эндогенных морфиноподобных соединений, анализ их взаимосвязи с традиционно выделяемыми эндокринной и нейромедиаторной системами будут способствовать дальнейшему прогрессу в изучении этиологии и патогенеза эндокринных и психических заболеваний, а также развитию учения о высшей нервной деятельности.

Глава 5

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НАРКОТИКОВ

Кроме взаимодействия со стероспецифическими рецепторами, определяющими фармакологический эффект наркотиков, последние существенно изменяют обмен веществ не только в нервной ткани, но и в клетках всего организма. Наркотические препараты — это прежде всего чужеродные для организма соединения, не имеющие трофической ценности, за исключением алкоголя, который, окисляясь в организме, дает как энергетический выигрыш, так и пластический материал для биосинтеза. Однако большие дозы или длительное употребление этанола могут привести к накоплению токсических продуктов и к существенной диспропорции в метаболических путях. В печени и в некоторых тканях организма существует защитная система против токсических и вообще чужеродных веществ. К ней относится цитоплазматическая сеть, содержащая в качестве центрального ферментативного компонента цитохром Р-450. Большинство наркотиков подвергается окислительному метаболизму именно в этой системе в реакциях гидроксилирования, деалкилирования и других с последующим образованием конъюгатов с глюкуроновой и серной кислотами. Следует отметить, что метаболические пути и скорость превращений соединений существенно зависят от химической природы наркотика.

Второй тип взаимодействия наркотиков с клеточными компонентами определяется их ассоциацией с биомембранами. Этот процесс в основном зависит от растворимости веществ в липидной фазе. Все наркотики в большей или меньшей степени жирорастворимы и, попадая в мембрану клеток и клеточных органелл, изменяют их свойства (избирательную проницаемость, текучесть, т. е. состояние жидкокристаллической структуры, способность к адсорбции молекул, прочность и др.).

Третий тип
ключевые пункты
следует отметить
окислительного
рактер эффект
ского препарат
длительно, или
К этому типу в
ного обмена, в
превращениями
наркотиков яв
тус организма
мы, т. е. взаи
кринными регу
димому, в бол
рактерные для

Для анали
смотрим данн
ния ряда нар
болизма и св
ребления нар

Влияние
биоэнергетику
соединениями
дования их эф
с использован
astel и А. Н
объяснить ан
ным действие
ловного моз
показав, что
тельной степ
и его произв
рость окисле
быка [Watts
ментов был
аналгезия с
ботки энерги
Однако при
вило под со
авторов был
рода изоли
субстратов
при добавл

Третий тип эффектов наркотиков — это влияние на ключевые пункты метаболизма. В первую очередь здесь следует отметить изменение под влиянием наркотиков окислительного и энергетического обмена, причем характер эффекта зависит не только от типа наркотического препарата, но и от того, вводился ли наркотик длительно, или имело место однократное воздействие. К этому типу воздействия относится и нарушение липидного обмена, в основном связанного с окислительными превращениями жиров. Еще одним важным эффектом наркотиков является их влияние на гормональный статус организма и на состояние нейромедиаторной системы, т. е. взаимодействие с эндокринными и нейроэндокринными регуляторными механизмами, которые, по-видимому, в большой степени определяют состояния, характерные для препаратов, вызывающих токсикомании.

Для анализа возможных механизмов действия рассмотрим данные, касающиеся непосредственного влияния ряда наркотиков на наиболее важные звенья метаболизма и сведения о последствиях хронического потребления наркотиков.

Влияние опиатов на окислительный метаболизм и биоэнергетику. Опиаты являются фармакологическими соединениями центрального действия, и поэтому исследования их эффекта на метаболизм вначале проводились с использованием препаратов мозговой ткани. J. H. Quastel и A. H. M. Wheatley (1933) впервые попытались объяснить аналгетический эффект морфина его возможным действием на окислительную активность тканей головного мозга при помощи манометрического метода, показав, что дыхание в срезах головного мозга в значительной степени подавляется морфином. Этот наркотик и его производное (метилморфин) снижали также скорость окисления янтарной кислоты в гомогенатах мозга быка [Watts D. T., 1949]. На основании этих экспериментов была предложена гипотеза, согласно которой аналгезия обусловлена подавлением морфином выработки энергии и окислительной активности ткани мозга. Однако применение более совершенных методов поставило под сомнение это предположение, так как рядом авторов было показано, что скорость потребления кислорода изолированными тканями мозга в присутствии субстратов цикла Кребса или глюкозы не ингибируется при добавлении морфина [Takemori A. E., 1968]. Более

того инкубация срезов мозга с морфином приводит к стимуляции гликолиза [Takemori A. E., 1967], но это повышение наблюдается только после 30-минутного лаг-периода. В то же время введение морфина животным вызывает через 1 ч в ткани мозга увеличение содержания глюкозы и некоторых интермедиатов начальных стадий гликолиза, что может свидетельствовать о торможении гликолиза. Однако при этом возрастает также уровень АТФ и креатинфосфата [Dodge R. W., Takemori A. E., 1972]. Как известно, уровень, а главное, соотношение адениннуклеотидов является существенным регуляторным звеном между системами аэробного окисления и гликолиза, причем регуляторное действие обусловлено не только акцепторным эффектом при фосфорилировании, как гликолитическом, так и окислительном, но и непосредственным влиянием адениннуклеотидов на отдельные стадии гликолиза.

Что же известно об изменениях, вызываемых морфином в этой регуляторной системе? В отличие от данных, полученных Р. W. Dodge и А. Е. Takemori (1972), А. G. Nasello и соавт. (1973) показали, что через 1 ч после введения морфина содержание АТФ снижается, причем только в коре полушарий головного мозга и таламусе. Установлено также, что уровень адениннуклеотидов в мозге, печени, почках и сердце падает уже в течение первого часа после введения морфина. В клетках HeLa также уменьшается содержание АТФ при выращивании их в среде, содержащей морфин [Noteboom W. D., Mueller G. C., 1969]. Изучение содержания АТФ в тканях может быть обусловлено как снижением эффективности окислительного фосфорилирования, так и уменьшением интенсивности гликолиза, в том числе и нарушением АТФ-азных реакций. Некоторые авторы показали, что введение морфина действительно снижает активность тканевой АТФ-азы [Наумов Ю. И., 1976; Datta S., 1971]. К сожалению, приведенные данные не всегда сопоставимы и, кроме того, противоречивы, а также не вносят ясности в сам механизм действия опиатов на такой важный вопрос, как биоэнергетика.

В связи с этим нами предпринята попытка исследовать механизм действия некоторых представителей опиатов (морфин, текодин, этилморфин, метилморфин и налорфин) на изолированных митохондриях печени

крысы как
ской системы
Необходим
зом опиаты
рование и 2
вия опиатов
стемами.

Для реше
производные
тохондрий, б
ме, разрабо
(1969). Эта
ного числа
лярографии
рости дыха
АТФ-синтета
ренциальной
новленности
возможности
ферментами
делить хара

Исследов
водные инги
тохондриях
стратов, та
ние (не свя
чувствитель
ков В. В.,
АТФ-синтет
чувствитель
новании че
атами цеп
дыхания и
хондрий. И
тохондрий
лительного
в результа
ну, либо з
ка в мито
ложение би
ингибиров
центраций
морфина н
тяков В. В.

крысы как модели полифункциональной биохимической системы.

Необходимо было исследовать: 1) каким образом опиаты влияют на окислительное фосфорилирование и 2) определить закономерность взаимодействия опиатов с мембранами и мембраносвязанными системами.

Для решения вопроса, являются ли морфин и его производные веществами, изменяющими функции митохондрий, был проведен ингибиторный анализ по схеме, разработанной в лаборатории В. П. Скулачева (1969). Эта схема позволяет при помощи ограниченного числа экспериментов, использующих методы полярографии с платиновым электродом (измерение скорости дыхания), регистрирующей рН-метрии (измерение АТФ-синтетазных и АТФ-азных реакций) и дифференциальной спектрофотометрии (регистрация восстановления дыхательных переносчиков), установить возможность взаимодействия испытуемых веществ с ферментами окислительного фосфорилирования, определить характер и механизм этого взаимодействия.

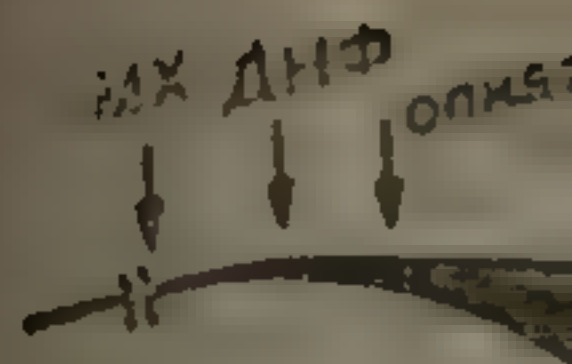
Исследования показали, что морфин и его производные ингибируют фосфорилирующее окисление в митохондриях в присутствии как НАД-зависимых субстратов, так и сукцината, причем разобщенное дыхание (не связанное с ферментами переноса энергии) не чувствительно к этим веществам [Гегенава Г. П., Чистяков В. В., 1975]. Измерение активности АТФ-азы и АТФ-синтазы в митохондриях показало одинаковую чувствительность данных параметров к морфину, на основании чего был сделан вывод об ингибировании опиатами цепи переноса энергии в системе сопряжения дыхания и фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий. Изучение субмитохондриальных частиц и митохондрий показало, что ингибирование морфином окислительного фосфорилирования может происходить либо в результате торможения переноса АДФ через мембрану, либо за счет блокирования фосфатного переносчика в митохондриальной мембране. Последнее предположение было исключено, так как кинетический анализ ингибирования, проведенный в присутствии разных концентраций фосфата, ясно указал на отсутствие влияния морфина на активность фосфатного переносчика [Чистяков В. В., Гегенава Г. П., 1976].

Еще одним доказательством в пользу подавления активности адениннуклеотидтранслоказы послужило наблюдение, свидетельствующее о снятии ингибирующего эффекта морфина высокими концентрациями аденозиндифосфата, подобно тому, что известно для атрактилизида. Однако имеется отличие между действием этих двух типов ингибиторов (опиаты и атрактилат). Так, эффект атрактилозида существенно не зависит от концентрации магния в среде, а для морфина и Mg^{2+} мы обнаружили конкурентные взаимоотношения.

Таким образом, кроме установления самого феномена ингибирования опиатами окислительного фосфорилирования, показано также, что этот процесс обусловлен блокированием активности одного из ферментов данной системы, а именно адениннуклеотидтранслоказы.

Каков же механизм взаимодействия молекулы опиата с ферментом? Мы попытались ответить и на этот вопрос. Известно, что в молекуле морфина и его производных существует фенантреновое ядро, подобная структура наблюдается и в молекуле атрактилозида. Кроме того, при сравнении представителей опийного ряда: морфина, текодина, метилморфина, этилморфина и налорфина, выявилась закономерность, свидетельствующая об увеличении эффективности опиата с возрастанием гидрофобности молекулы. Еще одно свойство в молекуле опиатов оказалось существенным для проявления ингибирующей активности — наличие положительного заряда у атома азота при физиологических значениях pH. Все опиаты, как известно, имеют рК (константу диссоциации NH^+) около 8, т. е. при более кислых значениях pH существенно возрастает число заряженных молекул и, по-видимому, этим объясняется конкурентность с Mg^{2+} при ингибировании окислительного фосфорилирования. Следует отметить, что ионы магния необходимы для нормального функционирования ферментов, связывающих адениннуклеотиды, и их вытеснение опиатами, естественно, снижает активность ферментов сопряжения дыхания и накопления энергии.

Действие опиатов на окислительное фосфорилирование в митохондриях не ограничивается только блокированием транспорта адениннуклеотидов через митохондриальные мембраны. В присутствии морфина и его



101
NH
DNF
опиат

Рис. 17. Кинетика в отсутствие (1) тилморфина (3), цин митохондрий. Стрелка в конце к определения всего

производных митохондрий в отсутствие разобщителей. Если в среде ионы калия. Замена K^+ на рующий эффект K^+ в среде ингибированию стимуляторов. Измерения митохондрий энергизация ионов из организма свидетельствует, что увеличивается энергия проникающая как и в случае яние опиатов с увеличением. Этот эффект, н, учитываем, процессы митохондрий

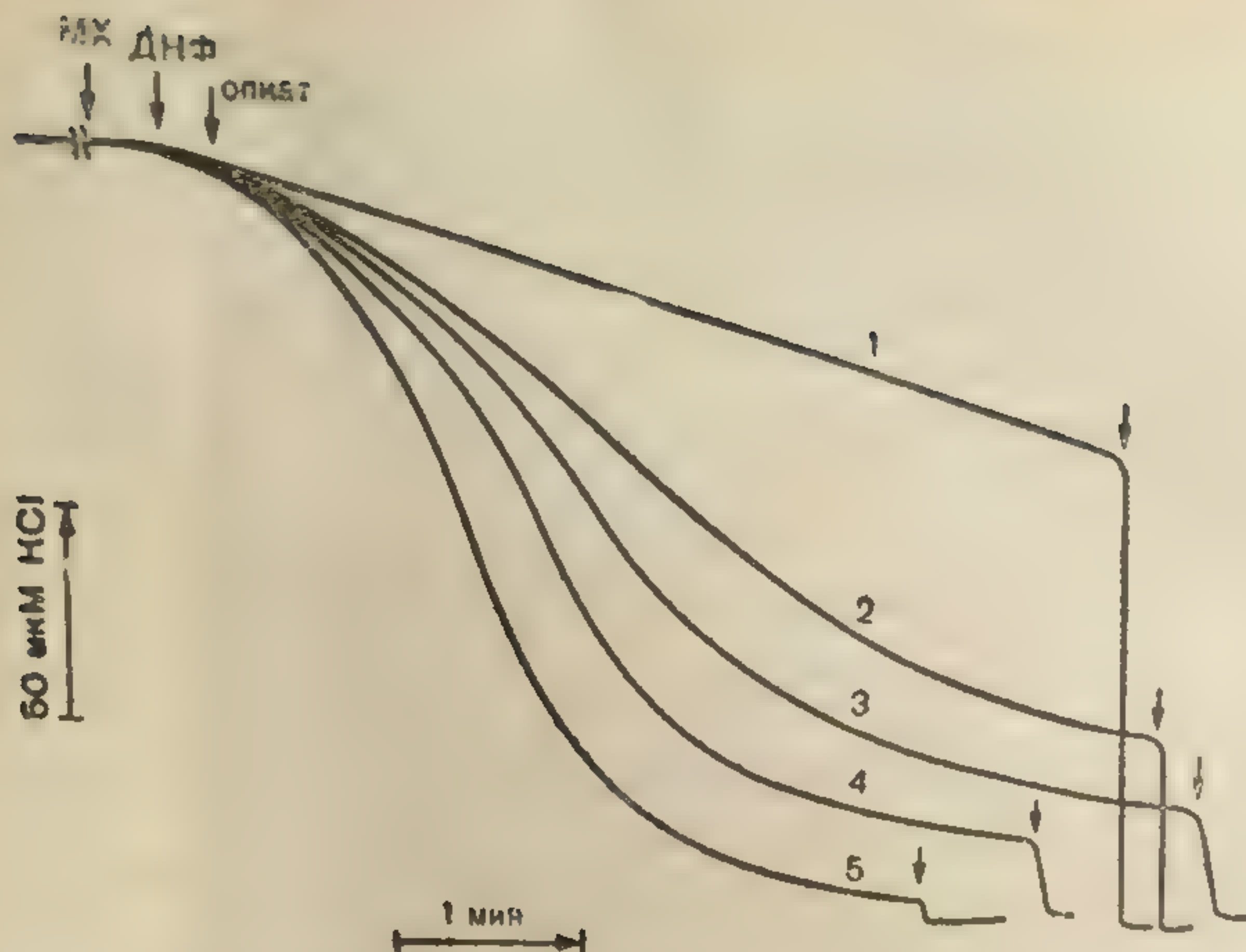


Рис. 17. Кинетика выхода K^+ из митохондрий (МХ) печени крысы в отсутствие (1) и в присутствии 5 мМ опиатов: морфина (2), метилморфина (3), этилморфина (4) и налорфина (5) при деэнергизации митохондрий динитрофенолом (ДНФ).

Стрелка в конце кривых — момент добавки детергента (третон X-100) для определения всего количества K^+ в митохондриях.

производных мы наблюдали ускорение дыхания митохондрий в отсутствие АДФ, но в отличие от типичных разобщителей эффект проявлялся только в том случае, если в среде инкубации митохондрий присутствовали ионы калия [Чистяков В. В., Гегенава Г. П., 1980]. Замена K^+ на Na^+ или холин предотвращала стимулирующий эффект опиатов. Увеличение же концентрации K^+ в среде инкубации с 10 до 100 мМ приводило к усилению стимулирующего эффекта морфина и его аналогов. Измерение концентрации K^+ в среде инкубации митохондрий показало, что в присутствии опиатов деэнергизация митохондрий приводила к выходу этих ионов из органелл в среду (рис. 17). Это прямо свидетельствует, что в данных условиях появляется (или увеличивается) эндогенная, в норме очень слабая) калиевая проницаемость митохондриальных мембран. Так же как и в случае окислительного фосфорилирования, влияние опиатов на калиевую проницаемость возрастало с увеличением гидрофобности молекулы опиата.

Этот эффект опиатов оказался для нас неожиданным, и, учитывая важную роль K^+ в биохимических процессах многих тканей и в первую очередь в тканях

мозга, весьма существенно было изучить механизм индукции проницаемости для калия биологических мембран. Образование калиевого канала (или переносчика K^+) производными морфина могло быть следствием двух причин: индукции транспорта калия через мембраны по типу валиномицина (искусственный калиевый канал) либо активации эндогенных систем калиевой проницаемости.

Первое предположение мы проверили, используя в качестве модели искусственную двухслойную фосфолипидную мембрану, которая в присутствии валиномицина становится проницаемой для K^+ . Добавление в среду с одной или с обеих сторон мембраны морфина или другого опиата не вызывает изменения ее электропроводности как в отсутствие, так и в присутствии K^+ [Гегенава Г. П., Чистяков В. В., 1979]. Следовательно, наблюдаемое в экспериментах на митохондриях увеличение транспорта калия через мембраны не является следствием непосредственного влияния морфина и его аналогов на мембраны этих органелл.

Второе наше предположение об активации эндогенных систем калиевой проницаемости митохондриальных мембран основывается на следующих соображениях и рассуждениях. В митохондриях, в синапсосамах K^+ , равно как и в клетках нервной ткани, осуществляет регуляторную функцию: в митохондриях эти ионы регулируют осмотическое давление, состояние заряженности мембран, а также, по-видимому, степень сопряженности в системе окислительного фосфорилирования, в синапсосамах и нервных клетках регулируют проведение первого импульса, высвобождение нейромедиаторов и др. Следовательно, в митохондриях и клетках должна быть эндогенная система, регулирующая содержание в них K^+ , тесно связанная с мембраной — уникальной структурой, обладающей избирательной и изменяющейся проницаемостью по отношению к тем или иным веществам. В митохондриях такой системой является система Ca^{2+} — фосфолипаза A_2 — лизокардиолипин. Собственно агентом, придающим мембране проницаемость для K^+ , предполагается, и не без оснований, лизокардиолипин [Евтодиенко Ю. В. и др., 1977], который образуется из кардиолипина фосфолипидов мембраны митохондрий под действием присутствующей в митохондриях фосфолипазы A_2 . Актив-

ность этого
концентрации
нами кальци
водящее к о
или другим
хондрией из
ведут к увели
риальных ме
циала митох

Как же
ваться в эту
му, именно
курировать
структурах.
ингибирует
дение морфи
 Ca^{2+} в сина
зыванию Ca
тагонистичес
проявлении
J. M. Van B
между морф
электрическ
рата кишки

Эксперим
частности С
казала, что
ции, достат
ратимой ст
болическом
стимуляции
чем без пр
ляется кос
фекте опио
вацией вну
при этом
бодные жи
сле 5-мину
ми морфи
свободных
дыдущих о
фина к на
положения
может слу

ность этого фермента резко повышается при увеличении концентрации свободного, несвязанного с мембранами кальция. Таким образом, любое воздействие, приводящее к освобождению Ca^{2+} из связи с мембранами или другими депо кальция, а также «нагрузка» митохондрий избыточным количеством Ca^{2+} обязательно ведут к увеличению калиевой проницаемости митохондриальных мембран и снижению энергетического потенциала митохондрий.

Как же морфин и его производные могут вмешиваться в эту сложную систему регуляции? По-видимому, именно благодаря тому, что опиаты способны конкурировать с Ca^{2+} за места связывания в мембранных структурах. Так, показано, что морфин конкурентно ингибирует связывание Ca^{2+} ганглиозидами мозга, введение морфина крысам вызывает снижение содержания Ca^{2+} в синаптических везикулах, морфин также препятствует связыванию Ca^{2+} в срезах мозга и, наконец, выявлены антагонистические взаимоотношения морфина и Ca^{2+} в проявлении морфинной анальгезии. F. A. Oprea и J. M. Van Ree (1979) установили четкую конкуренцию между морфином и Ca^{2+} при ингибировании морфином электрически стимулированного нервно-мышечного препарата кишки.

Экспериментальная проверка предположения о участии Ca^{2+} к эффекту опиатов в митохондриях показала, что «нагрузка» митохондрий Ca^{2+} в концентрации, достаточно большой, но еще не вызывающей необратимой стимуляции дыхания митохондрий в 4-м метаболическом состоянии, приводила к гораздо большей стимуляции дыхания этилморфином в присутствии K^+ , чем без предварительной «нагрузки» кальцием, что является косвенным подтверждением роли кальция в эффекте опиатов. Если эффект наркотиков связан с активацией внутримитохондриальной фосфолипазы A_2 , то при этом в митохондриях должны накапливаться свободные жирные кислоты. Как показал эксперимент, после 5-минутной инкубации митохондрий с производными морфина происходило увеличение концентрации свободных жирных кислот, причем, как и во всех предыдущих опытах, этот эффект возрастал в ряду от морфина к налорфину. Еще одним подтверждением предположения об активации фосфолипазы A_2 опиатами может служить тот факт, что повышение содержания

свободных жирных кислот в митохондриях предотвращается добавлением в среду инкубации ингибиторов фосфолипазы — ЭГТА (специфического к Ca^{2+} комплексообразователя) или местного анестетика — нуперкаина [Чистяков В. В., Гегенава Г. П., 1980].

Таким образом, анализ влияния опиатов на функции митохондрий позволил не только установить феномен нарушения этими веществами работы основной «энергетической станции» клетки, но и раскрыть механизм взаимодействия молекул опиатов с конкретными компонентами митохондриальных ферментных систем, что в конечном счете может помочь объяснить молекулярные механизмы действия этих наркотиков и на другие, чувствительные к ним структуры и биохимические процессы.

Суммируя вышеизложенное, можно сделать вывод, что опиаты ингибируют окислительное фосфорилирование в митохондриях, во-первых, за счет торможения активности переносчика адениннуклеотидов, во-вторых, в результате индукции калиевой проницаемости мембран митохондрий, что приводит к снижению энергетического потенциала. Для проявления этих эффектов существенными свойствами являются гидрофобность молекулы наркотика, наличие фенантренового ядра, а также существование положительного заряда при физиологических рН.

В свете изложенных нами собственных экспериментальных данных получает новую интерпретацию торможение морфином нейрональной активности ретикулярной формации, возбужденной болевым стимулом, поскольку для проявления подобного эффекта необходимо изменение потока моновалентных катионов через мембраны. D. T. Frazier и соавт. (1972) обнаружили подавление морфином скоростей возрастания и уменьшения потенциала действия на изолированном аксоне кальмара, причем действующие концентрации наркотика совпадают с теми, которые вызывали эффект в наших экспериментах (порядка 1 мМ). Авторы этой работы предполагали, что влияние морфина связано с нарушением потока моновалентных катионов через мембрану нейрона. Механизмы нарушения калиевой проницаемости в свете наших экспериментов теперь вполне объяснимы. Также становятся более понятными изменения уровня АТФ в тканях и активности АТФ-азы

после введения
отношения
ми при регио
атов.

Однако с
in vitro дейс
высока (поряд
концентрация
вестно, что л
пределяется
компонентам
скими свойст
лекулярная
деляет пассив
же в соответ
ренных биоло
и т. п.), что
эти факторы
ляются нера
или субклет
значительных
но в ряде р
мозга, почек
в этих ткан
в окружающ
и в органелл
тосомах [На
таболически
глощение оп
гликолиза.

Можно з
хондриях и
во-первых, з
активный т
зультате не
низм окисл

Знание з
и его произ
гетического
токсичность
лена блоки
и выключе
механизмов
всякое зна

после введения морфина и антагонистические взаимоотношения между морфином и адениннуклеотидами при регистрации анальгетической активности опиатов.

Однако следует отметить, что в экспериментах *in vitro* действующая концентрация опиатов довольно высока (порядка 10^{-3} М). Но может ли такая высокая концентрация реализоваться в условиях *in vivo*? Известно, что любое вещество, попавшее в организм, распределяется по органам, тканям и внутриклеточным компонентам в соответствии со своими физико-химическими свойствами (растворимость в воде и липидах, молекулярная масса и стерические факторы), что определяет пассивную составляющую распределения, а также в соответствии со специфическими свойствами внутренних биологических систем (ферментов, рецепторов и т. п.), что определяет активную составляющую. Все эти факторы приводят к тому, что вещества распределяются неравномерно, и в отдельных тканях, клетках или субклеточных органеллах могут накапливаться в значительных концентрациях. Так, опиаты, как показано в ряде работ, могут активно поглощаться срезами мозга, почек, а также лейкоцитами, и концентрация их в этих тканях в 10—12 раз превышает концентрацию в окружающем растворе. Морфин может накапливаться и в органеллах клеток: в ядрах, митохондриях и синаптосомах [Navon S., Laytha A., 1970]. При помощи метаболических ингибиторов было доказано, что это поглощение опиатов происходит активно за счет энергии гликолиза.

Можно заключить, что накопление опиатов в митохондриях и синаптосомах вызывает деэнергизацию, во-первых, за счет потребления энергии гликолиза на активный транспорт в органеллы и, во-вторых, в результате непосредственного действия опиатов на механизм окислительного фосфорилирования.

Знание закономерностей прямого действия морфина и его производных на процессы окислительного и энергетического метаболизма позволяет предполагать, что токсичность высоких доз опиатов может быть обусловлена блокированием не только нервного проведения, но и выключением или критическим ослаблением работы механизмов, снабжающих ткани энергией. Поскольку всякое знание предполагает активное его использова-

ние, то в данном случае открываются возможности направленного влияния на процесс взаимодействия морфина с мембранными и ферментными системами для снятия токсического действия этих наркотиков. Такими контрагентами могут быть адениннуклеотиды, двухвалентные катионы и, возможно, природные вещества, обладающие фенантреновой структурой, например стероиды. Однако эти предположения еще требуют своей проверки.

Опиаты и микросомальная система окисления. Вторая по мощности окислительная система клеток печени представляет собой связанную с цитохромом Р-450 монооксигеназу или микросомальную оксидазу со смешанной функцией. Этот ферментный комплекс осуществляет окислительно-восстановительные превращения эндогенных веществ, стероидов, жирных кислот и некоторых других липофильных соединений, а, кроме того, при помощи этой системы подвергаются окислительной детоксикации многие чужеродные вещества, тем или иным способом попавшие в организм. Монооксигеназа, связанная с цитохромом Р-450, присутствует в основном в тканях, обеспечивающих защитную функцию, таких, как печень (основное место для обезвреживания ксенобиотиков), обладающая самой мощной активностью, почки, легкие, кожа, слизистая оболочка кишечника, лейкоциты.

Поскольку опиаты имеют липофильность, значительно отличающуюся у разных представителей этой группы, их метаболизм в монооксигеназной системе существенно отличается. Для более липидорастворимых опиатов кодеина, этилморфина, налорфина и других характерно N- и O-деметилование, сопряженное с гидроксилированием, что сопровождается превращением субстрата в более водорастворимые соединения, содержащие гидроксильные группы, по которым идет присоединение (конъюгация) остатка глюкуроновой или серной кислот. Морфин же лишь в незначительной степени метаболизируется путем N-деметилирования (в пределах нескольких процентов от введенной дозы). Как наименее липидорастворимое из опиатов вещество морфин достаточно быстро выводится из организма либо в свободном виде, либо в виде глюкуронидов и других конъюгатов. Образованию глюкуронидов способствует и то обстоятельство, что в молекуле морфина при-

существуют две ги
бовать в реакции

Ранее высказ
ность к наркотик
их метаболизма
чени в результа
после многократ
[Axelrod J., 196
ний, например
казано, что их
ускоряется при
При этом сниж
барбитуратов, ч
рантности.

Однако в от
не наблюдается
ного ряда соп
ем толерантно
гистрируемому
при этом не о
ния скорости м
мое как по по
моче, так и по
изолированным
Более того, по
введение морф
жение метабо
мальной сист
Р-450 [Bousqu
1974]. При д
рость его N-д
ливается при
тересно, что
фина или на
активности м
chip J., Axel
существо связ
толерантности
окислительно
сети.

Как указ
тельной степ
щениям в ор
в изолирован

существуют две гидроксильные группы, способные участвовать в реакции конъюгации.

Ранее высказывалось предположение, что толерантность к наркотикам может быть обусловлена усилением их метаболизма в цитоплазматической сети клеток печени в результате индукции окислительных ферментов после многократного введения наркотических веществ [Axelrod J., 1968]. Действительно, для ряда соединений, например для некоторых барбитуратов, было показано, что их собственный окислительный метаболизм ускоряется при повторных введениях [Dole V. P., 1970]. При этом снижается или исчезает снотворный эффект барбитуратов, что свидетельствует о наступившей толерантности.

Однако в отношении опиатов такой закономерности не наблюдается. Хроническое введение наркотиков опиоидного ряда сопровождается существенным возрастанием толерантности к обезболивающему действию, регистрируемому по ряду фармакологических тестов, но при этом не обнаруживается сопутствующего увеличения скорости метаболизма вводимых веществ, измеряемое как по появлению метаболитов в плазме крови и моче, так и по активности окислительных ферментов в изолированных микросомах печени [Axelrod J., 1968]. Более того, показано, что однократное или хроническое введение морфиноподобных наркотиков вызывает снижение метаболизма веществ, окисляющихся микросомальной системой, и уменьшение уровня цитохрома Р-450 [Bousquet W. F. et al., 1964; Sladek N. E. et al., 1974]. При длительном введении морфина крысам скорость его N-деметилирования уменьшается и восстанавливается при отмене наркотика [Axelrod J., 1956]. Интересно, что инъекция антагониста наркотиков налорфина или налтрексона также приводит к снижению активности микросомальной системы окисления [Cochin J., Axelrod J., 1959], что также указывает на отсутствие связи между фармакологическими явлениями толерантности к опиоидным наркотикам и активностью их окислительного метаболизма в цитоплазматической сети.

Как указывалось выше, морфин в очень незначительной степени подвергается окислительным превращениям в организме и скорость его N-деметилирования в изолированных микросомах печени также невелика,

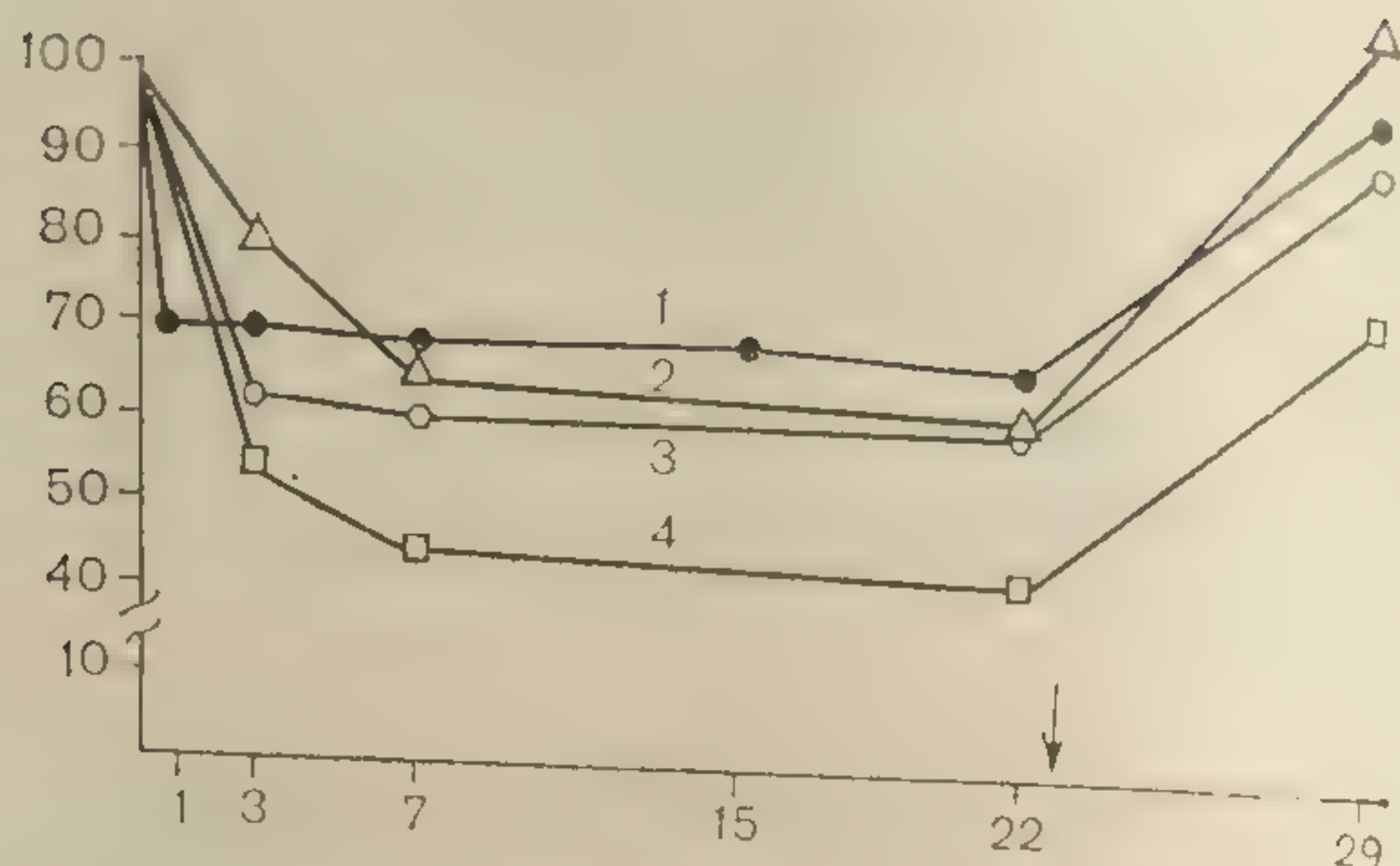


Рис. 18. Динамика изменения содержания цитохрома Р-450 (1), скорости окисления гексобарбитала (2), этилморфина (3) и тестостерона (4) в микросомальной фракции печени крыс, при хроническом введении этилморфина (50 мг/кг).

На оси абсцисс — продолжительность введения препарата (сутки); на оси ординат — измеряемые параметры (в процентах). Стрелка — момент отмены введения этилморфина.

поэтому можно было бы предположить, что этим объясняется отсутствие функциональной связи толерантности и активности микросомальной гидроксилазы. Мы провели исследование влияния длительного введения другого представителя опиатов — этилморфина — на параметры микросомальной окислительной системы. Этилморфин окисляется в этой системе с высокой скоростью и связывается с цитохромом Р-450, образуя спектрально регистрируемый комплекс I типа. Как показано на рис. 18, уже после однократного введения этилморфина содержание цитохрома Р-450 в микросомах печени уменьшается и снижается активность окисления самого этилморфина, гексобарбитала и тестостерона. Степень снижения активности окисления двух первых субстратов соответствует степени падения уровня цитохрома Р-450. Таким образом, независимо от структуры опиата и скорости его окисления в цитоплазматической сети любой представитель этого ряда наркотиков вызывает ингибирование окислительной детоксицирующей системы в клетках печени, которое сохраняется в течение всего периода введения наркотика. Следовательно, увеличение толерантности к обезболивающему действию наркотиков никак не связано с изменением активности микросомальной гидроксилазной системы. Эти наблюдения, однако, не должны рас-

смагиваться
сомальной
фекту опи
вания опи
ший эффек
1976].

Снижен
ной систем
ческого вв
существен
дения мор
барбитала
жение вел
лекарствен
показали,
мо снижен
ствующего
ни крыс
гораздо бо
таболизма
росомальн
свидетельс
цитохрома
но предпо
рация та
тохрома,
крыс.

Извест
в крови
было бы
ет количе
му) и в
вотным
наши эк
Введение
ной сист
в резуль
ва возра
но, в на
ления те
заны с у
Сход
соавт. (н
ное вве

смаиваться как указание на непричастность микросомальной монооксигеназы к фармакологическому эффекту опиатов. Известно, что реакции N-деалкилирования опиатоподобных веществ снижают анальгезирующий эффект веществ [Kosterlitz H. W., Waterfield A. A., 1976].

Снижение активности микросомальной окислительной системы в результате однократного или хронического введения наркотиков опиного ряда имеет существенные последствия. Так, после хронического введения морфина наблюдается усиление эффекта пентобарбитала (увеличение продолжительности сна и снижение величины LD_{50}), т. е. возрастает токсичность лекарственных веществ. В наших экспериментах мы показали, что длительное введение этилморфина, помимо снижения содержания цитохрома P-450 и соответствующего уменьшения окисления в микросомах печени крыс этилморфина и гексобарбитала, вызывает гораздо более резкое ингибирование окислительного метаболизма тестостерона, естественного субстрата микросомальной гидроксилазной системы (см. рис. 18). Это свидетельствует об изменении свойств (или формы) цитохрома P-450 при хронической наркотизации. Можно предположить, что в этих условиях падает концентрация так называемой андрогензависимой формы цитохрома, отсутствующей или резко сниженной у самок крыс.

Известно, что при длительном введении опиатов в крови снижается содержание тестостерона. Можно было бы думать, что уровень этого гормона регулирует количество цитохрома P-450 (определенную его форму) и введение тестостерона наркотизированным животным нормализует указанный показатель. Однако наши эксперименты свидетельствуют, что это не так. Введение гормона не изменило состояние гидроксилазной системы. В то же время известно, что сниженный в результате кастрации самцов уровень цитохрома снова возрастает после введения им тестостерона. Очевидно, в нашем случае снижение цитохрома P-450 и окисления тестостерона в микросомах печени не прямо связаны с уровнем гормона в организме.

Сходные наблюдения были сделаны N. E. Sladek и соавт. (1974), которые обнаружили, что предварительное введение морфина самкам крыс предотвращало

стимуляцию гидроксилазной системы после введения тестостерона. В другой работе показано, что кастрация самцов крыс и удаление у них гипофиза также приводят к снятию индуцирующего эффекта тестостерона на уровень цитохрома Р-450, на основании чего считают обязательным участие гипофиза в андрогензависимой регуляции активности микросомальной гидроксилазы [Kramer R. E. et al., 1979]. По-видимому, этилморфин вмешивается в регуляцию активности микросомальной системы на уровне гипофиза. Взаимоотношения же опитов с гормонами гипофиза рассматриваются в главе 4.

Влияние барбитуратов на митохондриальное окислительное фосфорилирование. В ранних исследованиях лаборатории J. H. Quastel, изучающей влияние наркотиков на окислительный обмен, показано, что дыхание срезов мозга угнетается наркотиками, в том числе и барбитуратами [Quastel J. H., Wheatley A. H. M., 1933]. В то время J. H. Quastel выдвинул гипотезу о непосредственной связи наркотического эффекта веществ с подавлением дыхательной активности ткани. В дальнейшем справедливость этой гипотезы для всех наркотиков не получила экспериментального подтверждения, однако она дала толчок для широкого и успешного исследования барбитуратов в отношении их действия на окислительный и энергетический метаболизм. Было замечено, что дыхание срезов мозга, стимулированное разобшителем (динитрофенолом), более чувствительно к барбитуратам, что указывало на возможное вовлечение митохондрий в реализацию эффекта барбитуратов, поскольку разобшители ускоряют дыхание только в митохондриях.

В экспериментах с изолированными митохондриями печени сначала удалось установить, что оксибарбитураты ингибируют окисление НАД-зависимых субстратов, но не сукцината [Aldridge W. H., Parker V. H., 1960]. Кроме того, рядом авторов показана способность барбитуратов также разобщать окисление и фосфорилирование [Cohen P. J., 1973]. Во многих лабораториях были предприняты попытки изучить механизм действия барбитуратов на митохондриальное окислительное фосфорилирование. Оказалось, что барбитураты ингибируют активность НАДН-дегидрогеназы дыхательной цепи, поэтому окисление сукцината не тормозится в присутствии амитала и родственных ему соединений [Co-

Р. J., 19
пленчатая
НАД⁺/НАДН
следнее несо
менить общи
динуклеотид
ферментов в
цессах.

При изуче
НАД-зависим
что степень
изменении рН
наблюдается
т. е. тогда, к
вины неонни
ства барбиту
лагать, что д
торой больш
Кроме того,
на митохонд
личины липи
ва Л. А. и д

Итак, окис
ляющихся п
вительно к п
торых амита
ко в митохо
альтернативн
окисления Н
окисления ра
мембране и
зой, связанно
передаются
не цитохром
внутренней
ление происх
(за исключе
жения), по
большого чи
ратов. Пере
ный путь мо
вредного во
мы рассматр
ния потока

nen P. J., 1973]. При этом происходит смещение потенциала окислительно-восстановительной пары НАД⁺/НАДН в сторону восстановленной формы. Последнее несомненно существенным образом может изменить общий метаболизм в клетке, поскольку пиринуклеотиды являются одним из ключевых кофакторов в окислительных и биосинтетических процессах.

При изучении механизма ингибирования окисления НАД-зависимых субстратов в митохондриях показано, что степень ингибирования существенно варьирует при изменении рН реакционной среды, оптимальный эффект наблюдается при рН, близких к рК_а для барбитуратов, т. е. тогда, когда присутствует в растворе около половины неионизированных молекул (рК_а для большинства барбитуратов около 8,0). В этой связи можно полагать, что для ингибирования важна кетоформа, в которой больше проявляется свойство гидрофобности. Кроме того, также отмечено, что эффект барбитуратов на митохондриальное окисление строго зависит от величины липидорастворимости барбитуратов [Ратникова Л. А. и др., 1978].

Итак, окисление в митохондриях субстратов, окисляющихся при помощи НАДН-дегидрогеназы, чувствительно к производным барбитуровой кислоты, из которых амитал и нембутал наиболее эффективны. Однако в митохондриях печени, но не сердца существует альтернативный не чувствительный к амиталу путь окисления НАДН [Ernster L. et al., 1955]. Эта цепь окисления расположена во внешней митохондриальной мембране и представлена особой НАДН-дегидрогеназой, связанной с цитохромом b₅, от которого электроны передаются во внутреннюю дыхательную цепь на уровне цитохромоксидазы. В указанной цепи в отличие от внутренней фосфорилирующей дыхательной цепи окисление происходит без запасаения энергии в виде АТФ (за исключением цитохромоксидазного пункта сопряжения), но при этом окисление устойчиво к действию большого числа ингибиторов, в том числе и барбитуратов. Переключение окисления на амиталрезистентный путь может служить защитной реакцией клетки от вредного воздействия гидрофобных веществ. Позднее мы рассмотрим возможные условия такого переключения потока электронов в альтернативных путях.

Т. Е. Conover и L. Ernster [цит. по К. Мартнус, 1962] установили, что добавление к митохондриям витамина K_3 (менадиона) способно обратить ингибирование амиталом окисления НАД-зависимых субстратов. В этом случае происходит шунтирование пункта дыхательной цепи, чувствительного к амиталу, таким образом, что электроны от НАДН через витамин K_3 передаются на цитохром внутренней митохондриальной мембраны. В митохондриях клеток печени существует специальный фермент витамин К-редуктаза [Мартнус К., 1962], который восстанавливает витамин K_3 от НАДН или НАДФН. В тканях, по-видимому, существует определенная концентрация витамина K_3 или его производных для обеспечения при необходимости шунтирования дыхательной цепи в условиях попадания в клетки токсических веществ, действующих на уровне НАДН-дегидрогеназы.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* выяснен биохимический механизм действия барбитуратов на митохондриальное окисление и найдены способы обращения ингибирования дыхания витамином K_3 , а также установлены возможности эндогенных систем шунтирования заблокированного амиталом участка дыхательной цепи (b_5 -шунт). Возникает вопрос, существуют ли те же закономерности, которые обнаружены на изолированных митохондриях, в целом организме? Попытки показать возможность торможения барбитуратами активности митохондриальной дыхательной цепи на целом органе были предприняты рядом авторов. Так, В. Chance и соавт. (1969) показали, что в ткани почки, перфузируемой раствором, содержащим амитал, происходит восстановление пиридиннуклеотида, т. е. ингибируется активность НАДН-дегидрогеназы. В. Brauer и соавт. (1969) наблюдали небольшое ингибирование дыхания печени крыс в результате введения в перфузат амитала. Однако эти эксперименты еще не отвечают на поставленный вопрос.

Чтобы показать возможность торможения дыхания введенными крысам барбитуратами, мы использовали метод полярографической регистрации потребления кислорода в тканевых препаратах печени (кусочки печени), изолированных через 15—20 мин после введения амитала или фенобарбитала [Ратникова Л. А., Чистяков В. В., 1978]. Оказалось, что заметный эффект ин-

гибирования дыхания введением амитала в ткань печени, представляется функцией печени, при дозе амитала, ответственной. Эти данные не достаточно токсичности барбитуратов тканей).

В специальных исследованиях, что добавление амитала кусочкам печени, как это видно из митохондриального диона, проникает в митохондрии введенный животным, что тормозящий эффект на ткани.

Этот факт подтверждает ингибирование барбитуратами, введенными в организм, действием их на дыхательную цепь. Витамин K_3 в организме при отравлении барбитуратами по определенным дозам барбитуратов вызывает значительное увеличение дыхания, если крысы Л. А., Чистяков заключают, что токсического действия на организм.

Помимо этого, субстратов в митохондриях вызывают также фосфорилирование, да были сделаны опыты, которые показывают, что снижение скорости окисления при окис-

гибирования дыхания кусочков печени наблюдается при введении амитала в дозе 100 мг/кг, а 30% ингибирование дыхания ткани (в условиях организма такой эффект представляет собой серьезную угрозу не только функции печени, но и жизни животного) достигалось при дозе амитала и фенобарбитала 300 и 800 мг/кг соответственно. Эти дозы барбитуратов вызывали значительную смертность среди крыс (условие необходимое, но не достаточное, чтобы считать одним из механизмов токсичности барбитуратов подавление дыхательной активности тканей).

В специальных экспериментах нами было показано, что добавление к инкубируемым в присутствии амитала кусочкам печени витамина K_3 приводит к активации дыхания, как это наблюдается в случае изолированных митохондрий, что указывает на способность менадиона проникать через клеточные мембраны и достигать митохондриальной дыхательной цепи. Витамин K_3 , введенный животным после амитала, полностью снимает тормозящий эффект барбитурата на скорость дыхания ткани.

Этот факт подтверждает предположение о том, что ингибирование окислительной активности печени барбитуратами, введенными в организм, вызвано взаимодействием их с НАДН-дегидрогеназой митохондриальной дыхательной цепи и дает основание считать витамин K_3 возможным антитоксическим агентом при отравлении барбитуратами. Действительно, в экспериментах по определению летальности крыс при введении высоких доз барбитурата (амитала), мы наблюдали значительное увеличение LD_{50} (со 150 до 217 мг/кг) в том случае, если крысам был введен витамин K_3 [Ратникова Л. А., Чистяков В. В., 1978]. Следовательно, можно заключить, что по крайней мере значительная часть токсического эффекта барбитуратов обусловлена их действием на митохондриальное окисление.

Помимо подавления окисления НАД-зависимых субстратов в митохондриях, некоторые барбитураты вызывают также снижение эффективности окислительного фосфорилирования. Первые наблюдения такого рода были сделаны еще в 1954 г. Т. М. Brody и J. A. Bain, которые показали на митохондриях мозга и печени снижение величины Р/О (коэффициент фосфорилирования) при окислении субстратов. Позднее установлено,

что разобщающим свойством обладают тиабарбитураты, такие, как тиопентал, бейтенал и тиабарбитал [Cohen R. J. 1973], а оксибарбитураты способны только ингибировать перенос электронов. Показано также и разобщающее действие оксибарбитуратов, но при их высоких концентрациях. Может ли реализоваться этот эффект *in vivo*, пока сказать трудно, поскольку разница в действующих концентрациях на митохондриях и в тканях, создаваемых введением этих барбитуратов животным в анестетических дозах, довольно велика (приблизительно в 10 раз).

Барбитураты и микросомальное окисление. Взаимодействие барбитуратов с микросомальной системой окисления (гидроксилирования) исследовалось во многих лабораториях и в самых разных аспектах. Это произошло в силу того, что некоторые барбитураты оказались легкогидроксилируемыми субстратами, а также индукторами микросомальных оксигеназ. История их изучения накопила немало фактов влияния длительного применения противосудорожных препаратов (большой частью барбитуратов) на чувствительность организма к тем же или другим лекарственным веществам, что связывали с возможностью индукции детоксицирующей ферментной активности в печени. Попытаемся систематизировать наши знания о взаимодействии барбитуратов с микросомальной, связанной с цитохромом Р-450 ферментной системой гидроксилирования.

Прежде всего следует рассмотреть необходимое условие взаимодействия — связывание барбитуратов с микросомами и с конкретными ферментами микросомальной окислительной системы. Показано, что при введении меченого фенобарбитала крысам значительная часть его поглощается клетками печени и быстро связывается с цитоплазматической сетью, причем наибольшее связывание происходит через 3 ч после введения барбитурата. Инкубация изолированных микросом с меченым фенобарбиталом также приводила к связыванию метки с этими клеточными компонентами, причем микросомы из мозга или скелетных мышц связывали фенобарбитал гораздо менее эффективно, чем микросомы из печени. Поскольку в отличие от печени ткани мышц и мозга не содержат цитохром Р-450, предполагалось, что именно цитохром Р-450 ответствен за связывание барбитурата.

Затем ус
тв (равно
микрооксигени
ко зарегист
рактеристик
к микросом
Р-450) инду
определенны
ральных из
385 нм и ми
изучали свя
ла, амобарб
изолированн
мами печен
блюдаются
ние опреде

После о
барбитурата
ному превр
го произво
в микросом
представите
интересно отм
тохромом
реакции ги
зависимост
учетом дол
венно и уч
лирования
никова Л.
чина скоро
не коррели
гексobarби
коэффицие
(равную л
ются по с
один из
микросома
так и *in v*
Было
барбитура
фект (на
увеличени
ной систем

Затем установили, что взаимодействие барбитуратов (равно как и других субстратов микросомальной монооксигеназы) с цитохромом Р-450 микросом можно зарегистрировать по изменению спектральных характеристик цитохрома. Барбитураты при добавлении к микросомам (а также и к очищенному цитохрому Р-450) индуцируют образование комплекса с вполне определенными спектральными свойствами (I тип спектральных изменений): максимум поглощения при 380—385 нм и минимум 425 нм. С. Von Bahr и соавт. (1974) изучали связывание ряда барбитуратов (гексобарбитала, амобарбитала, гептабарбитала и бутобарбитала) с изолированными клетками, гомогенатами и микросомами печени и показали, что во всех препаратах наблюдаются спектральные изменения I типа и связывание определяется липидорастворимостью веществ.

После образования комплекса цитохрома Р-450 с барбитуратами последний подвергается ферментативному превращению с образованием гидроксилированного производного. Скорость метаболизма барбитуратов в микросомах существенно отличается для разных представителей этого ряда лекарственных веществ. Интересно отметить, что как константа связывания с цитохромом Р-450 (K_s), так и кинетическая константа реакции гидроксилирования K_m имеют вполне четкую зависимость от липидорастворимости барбитурата с учетом доли недиссоциированной формы, которая собственно и участвует в процессах связывания и гидроксилирования на цитохроме Р-450 [Lee A. et al., 1971; Ратникова Л. А. и соавт., 1978]. Однако абсолютная величина скорости гидроксилирования разных барбитуратов не коррелирует с величиной липидорастворимости; так, гексобарбитал и фенобарбитал, имеющие одинаковый коэффициент распределения в системе октанол — вода (равную липидорастворимости), значительно различаются по скорости гидроксилирования; гексобарбитал — один из наиболее быстроокисляющихся субстратов в микросомальной системе, а фенобарбитал как *in vitro*, так и *in vivo* окисляется с очень низкой скоростью.

Было замечено, что при многократном введении барбитуратов снижается их фармакологический эффект (наличие толерантности). Это сопровождается увеличением активности микросомальной гидроксилазной системы, метаболизирующей чужеродные вещества,

в том числе и барбитураты. Сопоставление этих фактов позволило предположить их непосредственную взаимосвязь и назвать этот феномен метаболической толерантностью. Изучению механизма этого явления посвящено много работ. Классическим примером метаболической толерантности может служить применение фенобарбитала, снотворный эффект которого исчезает после нескольких введений, а в микросомах сильно активируется связанная с цитохромом Р-450 монооксигеназная система. Показано, что уже 3-кратное введение фенобарбитала приводит к увеличению массы печени, пролиферации цитоплазматической сети в гепатоцитах, увеличению микросомального белка и значительной (2—5-кратной) индукции цитохрома Р-450 и связанных с ним активностей [Rees D. E., 1979]. Уровень цитохрома Р-450 является хорошим показателем состояния микросомальной системы, и его часто используют для оценки степени индукции всего ферментного комплекса.

Изучение динамики индукции цитохрома Р-450 в печени в зависимости от длительности введения фенобарбитала показало, что уже через 1 сут после первого введения содержание цитохрома может увеличиться в $1\frac{1}{2}$ —2 раза, а при последующих повторных введениях происходит дальнейшее увеличение активности этой системы с максимумом через 3—7 сут и стабилизацией этого уровня [Orrenius S. et al., 1965], некоторым дальнейшим ростом [Valerino D. M. et al., 1974] или снижением до стационарного, но существенно выше контрольного уровня [Чистяков В. В. и др., 1974]. Параллельно этому, иногда с небольшим расхождением изменяются также активности гидроксилирования и N-деметилирования основных субстратов, используемых для характеристики функциональной активности микросомальной монооксигеназной системы: гексобарбитала, амидопирина, этилморфина, анилина.

Наступление полной толерантности к снотворному эффекту фенобарбитала регистрируется с некоторым запаздыванием по отношению к максимальной индукции цитохрома Р-450 [Чистяков В. В. и др., 1974], однако большинство исследователей считают, что толерантность к фармакологическому действию барбитуратов является прямым следствием усиления детоксицирующей функции печени. В то же время не все барбитураты и далеко не в равной степени проявляют инду-

цирующие свойства
оксигеназной систе
ключению, что ст
ответствующие а
внесут от време
плазме ($T_{1/2}$), т.
та барбитурата
компонентом, ко
Подобные же р
лаборатории [V
проследили дина
да активностей
пентобарбитал,
гексобарбитал)
дуктором оказа
10 ч. Гексобарб
цитохрома, и е
крови имел две
вызывали инду
но вполне опре
жуточные знач

Кроме дина
Р-450 и актив
системы, довол
исходящие в я
(процессы, при
топлазме и м
синтеза гема
с первых часо
1979]. Однако
дия взаимодей
мы или непос
непознанным.
ский рецепто
включает по
конечном сче
Р-450 в клет
Существен
микросомаль
ние реакции
ратов, но и д
названием г
ратоманы ср
дозам этано

цирующие свойства в отношении микросомальной монооксигеназной системы. D. Parke (1971) пришел к заключению, что степень индукции цитохрома P-450 и соответствующие активности прямо пропорционально зависят от времени полусуществования барбитурата в плазме ($T_{1/2}$), т. е. индукция зависит от времени контакта барбитурата в цитоплазме клетки с ферментом или компонентом, который является инициатором индукции. Подобные же результаты были получены и в другой лаборатории [Valerino D. M. et al., 1974], где авторы проследили динамику индукции цитохрома P-450 и ряда активностей шестью барбитуратами (фенобарбитал, пентобарбитал, секобарбитал, барбитал, тиопентал и гексобарбитал) на протяжении 14 сут. Наилучшим индуктором оказался фенобарбитал, его $T_{1/2}$ равняется 10 ч. Гексобарбитал не вызывал достоверной индукции цитохрома, и его период полусуществования в плазме крови имел две константы (7,4 и 36,2 мин). Остальные вызывали индукцию более слабую, чем фенобарбитал, но вполне определимую, и величины $T_{1/2}$ имели промежуточные значения.

Кроме динамики изменения количества цитохрома P-450 и активностей микросомальной монооксигеназной системы, довольно подробно исследованы явления, происходящие в ядре клетки после введения барбитурата (процессы, приводящие к синтезу РНК и белка), в цитоплазме и митохондриях, где происходят процессы синтеза гема и собственно цитохрома P-450, начиная с первых часов после введения индуктора [Rees D. E., 1979]. Однако самый начальный этап индукции — стадия взаимодействий индуктора с рецептором цитоплазмы или непосредственно в ядре — остается до сих пор непознанным. Не обнаружен еще тот стереоспецифический рецептор, соединение с которым фенобарбитала включает последовательность реакций, приводящих в конечном счете к увеличению содержания цитохрома P-450 в клетках.

Существенным следствием индукции барбитуратами микросомальной системы окисления является изменение реакции организма на введение не только барбитуратов, но и других соединений — явление, известное под названием перекрестной толерантности. Так, барбитураты сравнительно мало чувствительны к большим дозам этанола [Fraser H. E. et al., 1957; Rubin E., Lie-

ber C. S., 1971]. Больные эпилепсией, принимающие барбитураты, гораздо быстрее здоровых людей способны метаболизировать антипирин, что коррелирует с увеличением содержания цитохрома Р-450 в печени [Sotaniemi G. L. et al., 1978]. Роль индукции микросомальных ферментных систем для оценки действия лекарств обсуждена в работе А. М. Breckenridge и J. B. Roberts (1976). Известна также перекрестная толерантность между фенотиазинами и барбитуратами у людей. Мы в экспериментах на крысах также показали [Чистяков В. В. и др., 1977], что индукция гидроксилазной системы фенобарбиталом существенно снижает длительность и выраженность аминазиновой каталепсии.

Взаимодействие окислительных систем клетки как способ защиты от токсического действия барбитуратов. Выше было указано, что барбитураты могут взаимодействовать с окислительными системами и митохондрией, и цитоплазматической сети. Основной эффект на митохондриях — это ингибирование переноса электронов в дыхательной фосфорилирующей цепи, а в цитоплазматической сети происходит окисление барбитуратов, т. е. наблюдается стимуляция потребления кислорода тканями и обезвреживание барбитуратов благодаря превращению их в менее токсические гидроксилированные продукты. Эти эффекты отмечены как на изолированных клеточных органеллах (митохондриях и микросомах), так и на препаратах ткани и в целом организме.

Существование в клетке двух мощных окислительных систем уже само по себе должно предполагать возможности их взаимодействия, тем более чем обе дыхательные цепи используют в качестве одного из субстратов восстановленный пиридиннуклеотид, а следовательно, имеются условия для конкурентных взаимоотношений. Барбитураты, как известно, вызывают ингибирование переноса электронов в дыхательной цепи митохондрий на уровне НАДН-дегидрогеназы, т. е. при этом степень восстановленности пиридиннуклеотидов возрастает. В то же время барбитураты, находящиеся в цитоплазме клетки, связываются с цитохромом Р-450, и образующийся комплекс в присутствии кислорода готов к ферментативной реакции гидроксилирования, которая теперь зависит от донора электронов (восстановленных пиридиннуклеотидов). Таким образом, с од-

ной стороны, б
копление) в м
их комплекс с
эти восстанов
вания (детокс
рим более под
тверждающие
окислительных

L. S. Yagiz
щества с гидро
разным класс
НАДН-дегидро
ингибирования
единения (коэ
октанол — вода
системе мембр
вает логарифм
щества прямой
эффекта ра

Для барби
степенью корр
чески охаракте
с учетом доли
при данном рН
ного взаимодей
зой митохонд
г — коэффициент
мость с выраж
ингибиторов Н
широкого рН
 $= 1,04 \lg P + 0$
отличаются др
рая больше у
шую их эффек
гидрофобным
взаимодействи
ским связыва
кислоты. Граф
сти приведено

Как уже п
тов с цитохро
ной системы т
ко зависимость
спектрально о

ной стороны, барбитураты увеличивают (вызывают накопление) в митохондриях НАДН, а с другой стороны, их комплекс с цитохромом Р-450 может использовать эти восстановленные эквиваленты для гидроксилирования (детоксикации) данных барбитуратов. Рассмотрим более подробно экспериментальные данные, подтверждающие возможность такого взаимодействия двух окислительных цепей в клетках печени.

L. S. Yaguzhinsky и соавт. (1973) показали, что вещества с гидрофобными свойствами, принадлежащие к разным классам химических соединений, ингибируют НАДН-дегидрогеназу митохондрий, и эффективность ингибирования зависит от степени гидрофобности соединения (коэффициента распределения Р в системе октанол — вода, которая наиболее близка к природной системе мембрана — буфер). Эта зависимость связывает логарифм константы ингибирования данного вещества прямой пропорциональностью с логарифмом коэффициента распределения.

Для барбитуратов подобное соотношение с высокой степенью корреляции было нами выявлено и математически охарактеризовано [Ратникова Л. А. и др., 1978] с учетом доли недиссоциированной формы барбитурата при данном рН, что доказывает роль именно гидрофобного взаимодействия ингибитора с НАДН-дегидрогеназой митохондрий: $\lg K_i = 1,05 \lg P + 1,62$; $r = 0,97$, где r — коэффициент корреляции. Сравнивая эту зависимость с выражением, полученным для неспецифических ингибиторов НАДН-дегидрогеназы (для представителей широкого ряда химических соединений): $\lg K_i = 1,04 \lg P + 0,646$; $r = 0,96$, можно заметить, что они отличаются друг от друга величиной константы, которая больше у барбитуратов и отражает гораздо большую их эффективность по сравнению с любым другим гидрофобным ингибитором. Отсюда мы заключаем, что взаимодействие барбитуратов обусловлено специфическим связыванием с ферментом остатка барбитуровой кислоты. Графическое выражение указанной зависимости приведено на рис. 19.

Как уже говорилось выше, связывание барбитуратов с цитохромом Р-450 микросомальной гидроксилазной системы тоже носит гидрофобный характер. Однако зависимость логарифма константы связывания (K_s — спектрально определяемая величина, характеризующая

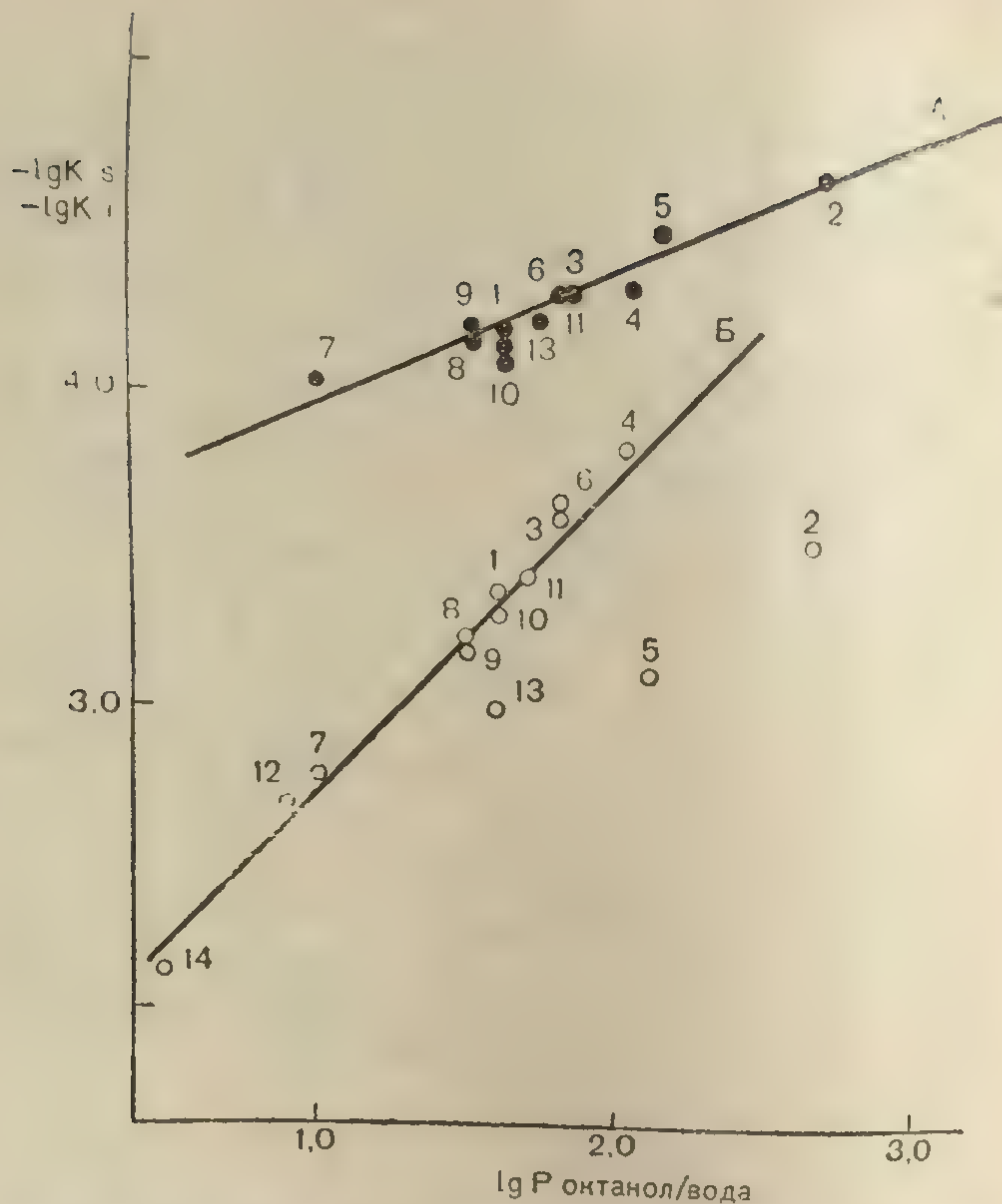


Рис. 19. Эффективность взаимодействия барбитуратов различной гидрофобности с микросомальной и митохондриальной окислительными системами.

А — зависимость константы связывания барбитуратов с цитохромом Р-450 (K_s) от величины коэффициента распределения в системе октанол — вода ($P_{\text{октанол/вода}}$); Б — зависимость константы ингибирования (K_i) барбитуратами митохондриальной НАДН-дегидрогеназы от $P_{\text{октанол/вода}}$. 1 — гексобарбитал; 2 — гептабарбитал; 3 — пентобарбитал; 4 — секобарбитал; 5 — циклобарбитал; 6 — амобарбитал; 7 — апроарбитал; 8 — бутобарбитал; 9 — винбарбитал; 10 — аллилнеопентилбарбитуровая кислота; 11 — аллилбутилбарбитуровая кислота; 12 — диаллилбарбитуровая кислота; 13 — фенобарбитал; 14 — барбитал.

образование комплекса цитохрома Р-450 с барбитуратом) от логарифма коэффициента распределения имеет неявную прямую пропорциональность (низкий коэффициент корреляции). Когда же величины K_s для барбитуратов были рассчитаны с учетом недиссоциированной формы при заданном значении рН, а коэффициент

ты распределе...
анол — вода (P)
для системы...
между K_s и P
решим
 $= 0,44 \lg P + 3,5$
На рис. 19 про
зависим

Так как бар...
стратами микро...
торами митохон...
ставляет интер...
корреляции. Ве...
центрациям ве...
ферментом дост...
ным моментом...
ных зависимост...
димый на графич...
прямых? Во-пе...
микросомальног...
большем сродст...
стемы. Во-втор...
что с увеличени...
степени растет...
НАДН-дегидрог...
коэффициентом...
вающие полума...
мыми для обеи...

На основании...
положение. Ба...
мостью, попада...
зируются) гид...
ской сети и вс...
тате предпочт...
именно с этим...
ва же с высоко...
ном заполненн...
зывают также...
ного фермента...
ленных пириди...
что лимитирую...
нобиотиков на...
становления ко...
руемое веществ...

ты распределения были пересчитаны для системы октанол — вода (в литературе эти параметры были даны для системы кукурузное масло — вода), оказалось, что между K_s и P существует линейная зависимость с хорошим корреляционным коэффициентом: $\lg K_s = 0,44 \lg P + 3,54$; $r = 0,92$ [Ратникова Л. А. и др., 1978]. На рис. 19 представлено графическое выражение указанной зависимости.

Так как барбитураты являются одновременно субстратами микросомального цитохрома Р-450 и ингибиторами митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, представляет интерес сравнить показанные на рис. 19 корреляции. Величины K_s и K_i соответствуют тем концентрациям веществ, при которых степень связывания с ферментом достигает 50% от максимальной. Существенным моментом в сравнительной оценке двух представленных зависимостей является различный наклон, хорошо видимый на графике. О чем же говорит такое расположение прямых? Во-первых, верхнее положение прямой для микросомального цитохрома свидетельствует о гораздо большем сродстве к барбитуратам гидроксилазной системы. Во-вторых, схождение прямых указывает на то, что с увеличением гидрофобности вещества в большей степени растет сродство к нему митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, т. е. для барбитурата с высоким коэффициентом распределения P концентрации, вызывающие полумаксимальный эффект, становятся сравнимыми для обеих ферментных систем.

На основании этого можно сделать следующее предположение. Барбитураты с низкой липидорастворимостью, попадая в клетку, связываются (и метаболизируются) гидроксилазной системой цитоплазматической сети и вследствие большего сродства, и в результате предпочтительной вероятности взаимодействия именно с этими мембранными структурами. Вещества же с высокой гидрофобностью при почти максимальном заполнении активного центра цитохрома Р-450 вызывают также заметное ингибирование митохондриального фермента, что приводит к накоплению восстановленных пиридиннуклеотидов. Здесь следует отметить, что лимитирующей стадией при гидроксилировании ксенобиотиков на цитохроме Р-450 является реакция восстановления комплекса цитохром Р-450 — гидроксилируемое вещество [Archakov A. I. et al., 1974]. В рас-

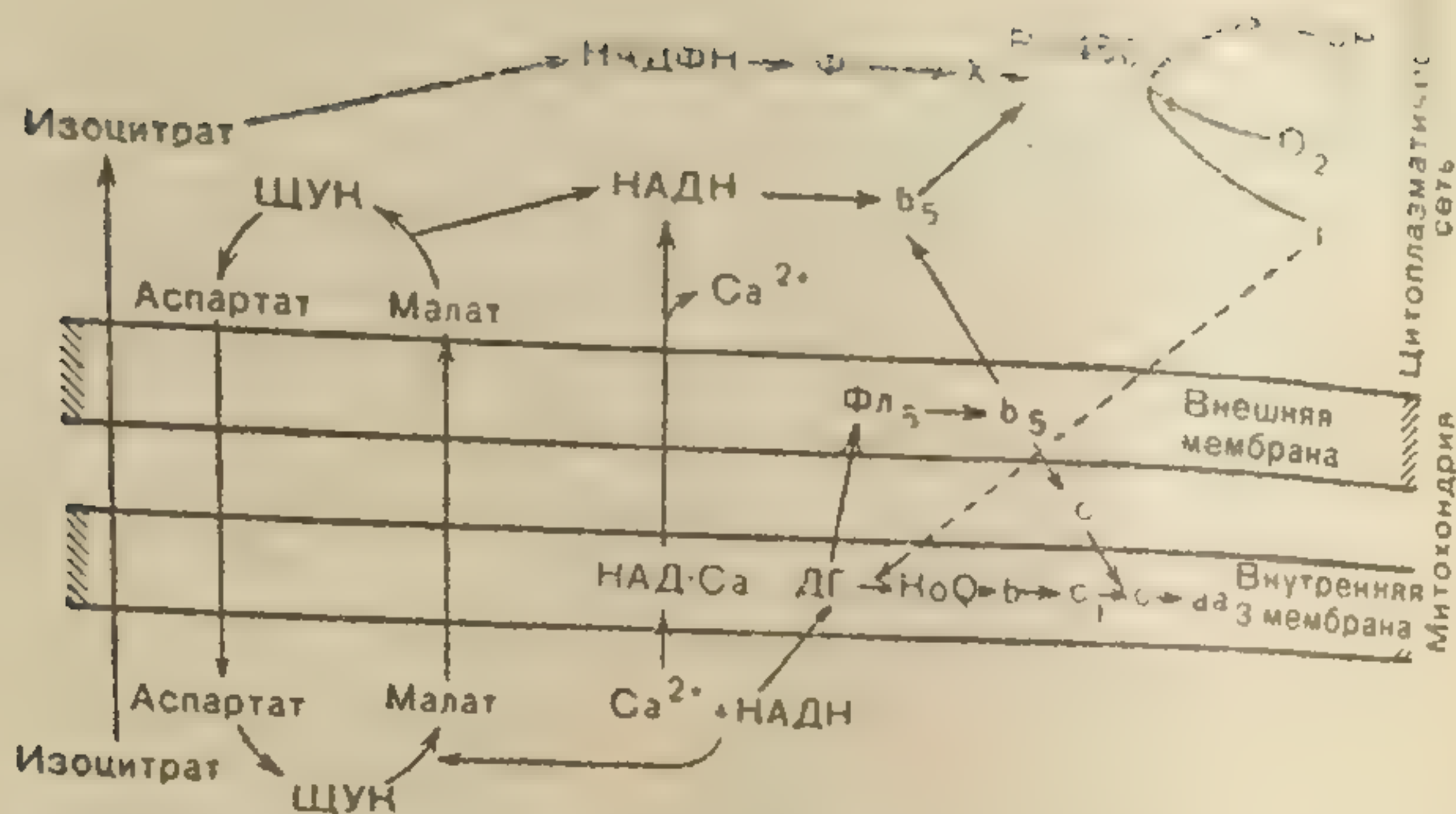


Рис. 20. Схематическое изображение взаимодействия митохондриальных и микросомальных окислительных систем при действии ингибиторов типа барбитуратов.

ДГ — дегидрогеназа; Фл — флавопротеин; I и I—ОН — ингибитор (барбитурат) и гидроксилированный ингибитор соответственно; ЩУК — щавелевоуксусная кислота; X — неизвестный компонент гидроксилазной системы микросом.

смаатриваемой ситуации появляется возможность дополнительной передачи электронов на цитохром Р-450 за счет митохондриальных восстановительных эквивалентов, возможность, создаваемая самим гидроксилируемым (и ингибиторным) веществом и тем большая, чем более гидрофобно соединение. В этом и заключается постулируемый нами регуляторный механизм взаимодействия двух окислительных систем [Ратникова Л. А. и др., 1978]. Схематично указанные взаимоотношения представлены на рис. 20. Конкретные механизмы, при помощи которых электроны (или в общем случае восстановительные эквиваленты) могут передаваться из митохондрий в цитоплазматическую сеть, рассмотрены в этой работе. Здесь же укажем только основные принципы механизмов взаимодействия.

Простого диффузионного транспорта восстановленных пиридиннуклеотидов из митохондрий в цитоплазму, по-видимому, не происходит, так как внутренняя митохондриальная мембрана не проницаема для них. Но в клетке существуют так называемые малат-аспаратный и изоцитратный челночные шунты, при помощи которых осуществляется опосредованный перенос пиридиннуклеотидов. Кроме того, показана возможность переноса НАДН через митохондриальную мембрану в

1
комплексе с Ca^{2+} , и такой механизм переноса по крайней мере для барбитуратной регуляции взаимодействия вполне реален, поскольку известны факты изменения барбитуратами способности Ca^{2+} связываться с мембранами [Thyrum P. T. et al., 1971]. Другая принципиальная возможность переноса восстановительных эквивалентов из митохондрий в цитоплазматическую сеть заключается в межмембранном взаимодействии переносчиков электронов митохондриальной и микросомальной цепей на уровне цитохромов b_5 .

В лаборатории А. И. Арчакова на изолированных препаратах митохондрий и микросом такая возможность была показана [Арчаков А. И., 1975]. Во внешней мембране митохондрий печени существует альтернативная фосфорилирующей дыхательной цепи окислительная система, в которой НАДН окисляется через цитохром b_5 по пути, не чувствительному к барбитуратам. В микросомальной мембране также присутствует цитохром b_5 , очень сходный по свойствам с митохондриальным. По данным электронно-микроскопических исследований, в клетках печени наблюдается непосредственный контакт между внешней мембраной митохондрий и мембранами цитоплазматической сети. Все приведенные факты свидетельствуют в пользу предположения о возможности межмембранного взаимодействия двух окислительных систем в клетках печени, и одной из предпосылок такого взаимодействия может быть влияние веществ типа барбитуратов, ингибирующих митохондриальную дыхательную цепь с накоплением НАДН, который, окисляясь цитохромом b_5 внешней мембраны и далее отдавая электроны на микросомальный цитохром b_5 , поддерживает, таким образом, усиленное гидроксилирование барбитуратов в цитоплазматической сети.

Интересно, что подобный тип взаимодействия, по-видимому, индуцируется при длительном введении барбитуратов. Регистрируя изменения количества цитохромов в митохондриях и микросомах печени крыс в динамике при длительном введении фенобарбитала, мы обнаружили, кроме известного увеличения уровня цитохрома P-450 в микросомах через 3—4 сут ежедневного введения, значительное возрастание (в $2\frac{1}{2}$ раза) количества цитохрома b_5 в митохондриях через 6—8 сут после начала наркотизации [Чистяков В. В. и др., 1974].

При этом содержание цитохрома b_5 в микросомах не претерпевает существенных изменений. Динамика наблюдаемых вариаций содержания митохондриального цитохрома b_5 характеризуется максимальным увеличением в момент достижения толерантности к гипнотическому эффекту фенобарбитала и сохранением этого уровня на протяжении длительного времени. Специальными экспериментами показано, что этот индуцированный цитохром b_5 может быть восстановлен от субстратов внутренней дыхательной цепи митохондрий. Отсюда предполагается, что роль таких изменений содержания цитохрома заключается в обеспечении адаптационных биохимических механизмов, основанных на взаимодействии окислительных систем митохондрий и эндоплазматической ретикулы в условиях длительной наркотизации барбитуратами.

Кроме участия в функциональной связи двух окислительных систем, цитохром b_5 внешней митохондриальной мембраны является нормальным компонентом не чувствительной к барбитуратам (и другим гидрофобным ингибиторам) внешней дыхательной цепи, которая включается в условиях торможения работы внутренней НАДН-дегидрогеназы и сохраняет только один из трех пунктов фосфорилирования на уровне цитохром-оксидазы. В. В. Чистякова и соавт. (1974) показали, что активность внешней цепи окисления в митохондриях повышается уже после 2-кратного введения фенобарбитала и снижается после активации межмембранного взаимодействия в адаптационной стадии длительного введения барбитурата. Таким образом, внешний не чувствительный к барбитуратам путь окисления НАДН в митохондриях служит резервной защитной системой, предохраняющей окислительный метаболизм от токсического действия барбитуратов на доадаптационной стадии при хроническом введении наркотика.

Действие этанола на окисление и биоэнергетику. В отличие от прочих наркотиков этанол не является в полной мере чужеродным для организма веществом; в определенных условиях он может образовываться в небольших количествах в тканях благодаря обращению альдегид- и алкогольдегидрогеназных реакций при наличии пирувата или ацетил-КОА, попадать в организм в результате жизнедеятельности естественной микрофлоры кишечника и др. В организме этанол подвергается

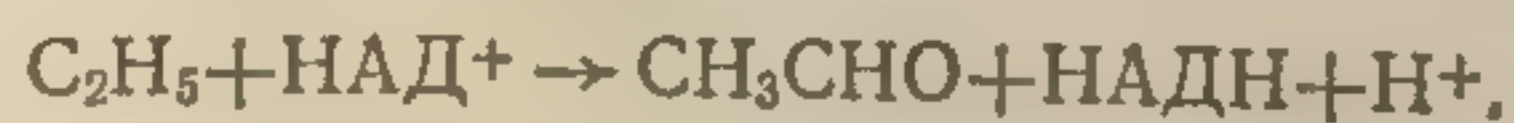
связи быстрому
специальным
каталазы) или
системы. Образуются
итого ацетат и
длительных пре
разом, служат
АТФ. Казалось
но утилизируются
тогда состоит
ини и патолог
действие? Ведь
ческим алког
рушений метабо
метаболическо
гипогликемия,
тролитного ба
сферы и друг
патологические
цирроз). Дал
яснены, но к
в расшифровк
на молекуляр
Во многих
но данных, по
сические эфф
щие при длит
отличаются, и
пола обуслов
Рассмотрению
других орган
ров, к некото
ber C. S., 19
ton K. F. et
Первой ст
когольдегидро

Данная р
назой (АДГ)
ки. Наиболь
в печени, хо
АДГ имеет
торых может

ется быстрому и эффективному окислению при помощи специальных ферментов (алкогольдегидрогеназы, каталазы) или микросомальной этанолюкисляющей системы. Образующиеся при этом продукты (в конечном итоге ацетат и НАДН) являются субстратами для окислительных превращений в митохондриях и, таким образом, служат источником накопления энергии в виде АТФ. Казалось бы, этанол является легко и эффективно утилизируемым субстратом в клетках, а в чем же тогда состоит его токсическое при однократном введении и патологическое при хроническом потреблении? Ведь хорошо известно, что у больных хроническим алкоголизмом обнаружен широкий спектр нарушений метаболизма и эндокринных функций: гиперметаболическое состояние, подобное тиреотоксикозу, гипогликемия, кетоацидоз, нарушение водного и электролитного баланса, гормональные нарушения половой сферы и другие эндокринные расстройства, глубокие патологические изменения в печени (ожирение, гепатит, цирроз). Далеко не все механизмы этих нарушений выяснены, но к настоящему моменту многое уже сделано в расшифровке действия алкоголя и его метаболитов на молекулярном уровне.

Во многих лабораториях мира накоплено достаточно данных, позволяющих утверждать, что острые токсические эффекты алкоголя и нарушения, возникающие при длительном злоупотреблении им, существенно отличаются, и подавляющее большинство эффектов этанола обусловлено продуктами окисления его в тканях. Рассмотрению путей метаболизма этанола в печени и других органах посвящено много обстоятельных обзоров, к некоторым из них мы и отсылаем читателя [Lieber C. S., 1973; Ugarte G., Iturriaga H., 1976; Tipton K. F. et al., 1978].

Первой стадией в окислении этанола является алкогольдегидрогеназная реакция:



Данная реакция катализируется алкогольдегидрогеназой (АДГ) — ферментом цитозольной фракции клетки. Наибольшее количество этого фермента находится в печени, хотя он присутствует почти во всех тканях. АДГ имеет несколько изоферментов, соотношение которых может определять скорость метаболизма этано-

ла. Указанное соотношение генетически предопределено и, по-видимому, обуславливает в определенной степени различную чувствительность людей к алкоголю и последствия длительного употребления его. Следует отметить, что АДГ не имеет строгой специфичности к этанолу и в норме обеспечивает окислительные превращения эндогенных метаболитов, содержащих спиртовую группу. Отсюда очевидно, что введение этилового спирта «загружает» АДГ и препятствует нормальному метаболизму естественных субстратов, что и приводит к той или иной патологии.

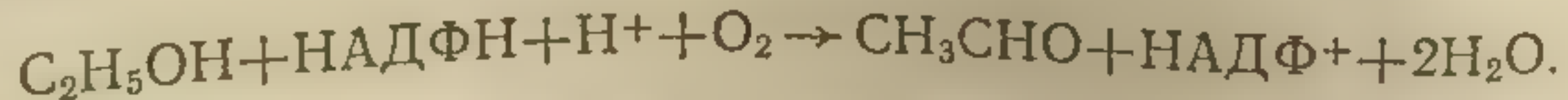
При помощи ингибитора АДГ — пиразола, который образует третичный комплекс с АДГ и НАД⁺, установлено, что основная часть этанола, попадающего в организм, окисляется именно в результате алкогольдегидрогеназной реакции (от 75 до 90%). Остальная часть этанола подвергается окислению в других системах (каталазной и микросомальной этанолюкисляющей).

Каталаза осуществляет окисление этанола по следующей схеме:



Эта реакция обязательно сопряжена с реакциями, в результате которых образуется перекись водорода, например с ксантиноксидазной или глюкозооксидазной, и происходит в основном в пероксисомах. Эффективным ингибитором каталазы является 3-амино-1,2,4-триазол. Однако роль этого пути в общем метаболизме алкоголя, по-видимому, незначительна и не обнаружена заметной активации каталазного пути окисления этанола при длительной алкоголизации животных.

Третьей системой, связанной с непосредственным окислением молекулы этилового спирта, является так называемая микросомальная этанолюкисляющая система (МЭОС). Как видно из ее названия, она локализуется в мембранах цитоплазматического ретикулума (в препаратах микросом) печени и катализирует реакцию:



Показано, что МЭОС обязательно содержит цитохром Р-450, а в связи с тем, что реакция частично чувствительна к аминотриазолу, заключают об участии на промежуточной стадии перекиси водорода, вероятно,

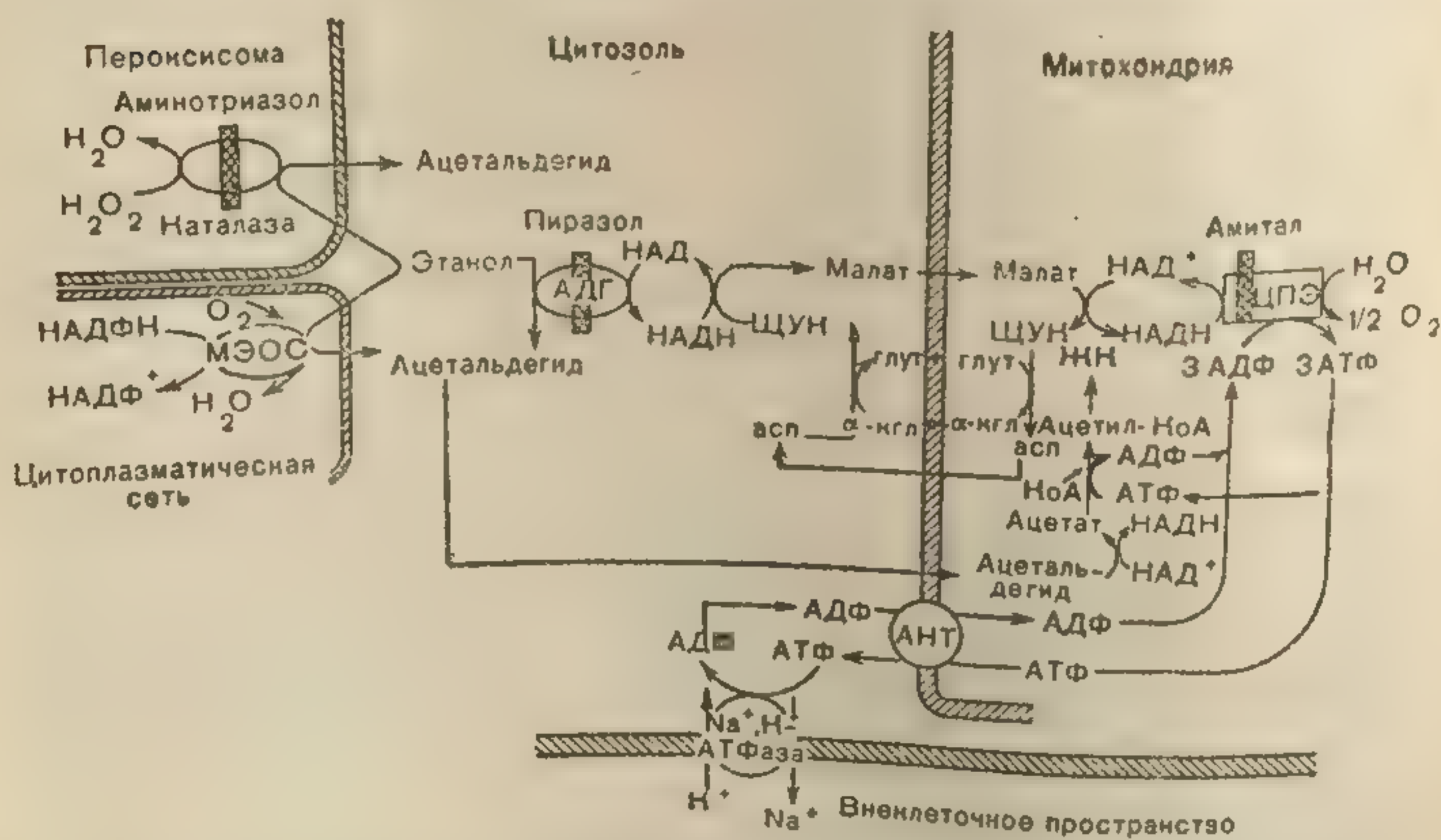
образующейся
здоровых
20—20% этано
лине от двух
ируются при
вается как ее
Р-450). В то
пичными инду
щественно не
из крови пост
вотному. Это
МЭОС, индуци
курсе введения
роли МЭОС
свойств АДГ
равна 2 мМ, а
т. е. этанол п
имущественно
ции этанола
на срезах пече
этанола с 5 д
ем скорости е
уже насыщен
включается в
организм пог
котика.

Таким обр
превращается
ство вследствие
сти. Как по
концентрации
зуют такие
нейшим пре
чени. Если
жидкости пр
удаляется н
условиях in
явления, на
значительно
стоятельств
ацетальдегид
проявления
ления этано
но на токс

образующейся в НАДФН-оксидазной реакции. В печени здоровых животных эта система окисляет около 10—20% этанола, вводимого в организм, однако в отличие от двух предыдущих систем ее ферменты индуцируются при длительном введении алкоголя (усиливается как ее активность, так и содержание цитохрома Р-450). В то же время индукция цитохрома Р-450 типичными индукторами, например фенобарбиталом, существенно не влияет на скорость элиминации этанола из крови после однократного введения алкоголя животному. Это может свидетельствовать о специфичности МЭОС, индуцируемой самим этанолом при длительном курсе введения. Некоторую информацию о специальной роли МЭОС дает обнаружение разницы кинетических свойств АДГ и МЭОС: константа Михаэлиса для АДГ равна 2 мМ, а для микросомальной системы — 8,6 мМ, т. е. этанол при низкой концентрации окисляется преимущественно с участием АДГ, возрастание концентрации этанола приводит к увеличению роли МЭОС. Так, на срезах печени показано, что изменение концентрации этанола с 5 до 60 мМ сопровождалось 60% увеличением скорости его окисления (т. е. в условиях, когда АДГ уже насыщена субстратом). Предполагают, что МЭОС включается в метаболизм введенного этанола, если в организм попадает избыточное количество этого наркотика.

Таким образом, с участием всех трех систем этанол превращается в ацетальдегид, высокотоксичное вещество вследствие своей большой реакционной способности. Как показано на перфузируемой печени, низкие концентрации этанола в процессе метаболизма образуют такие количества ацетальдегида, которые дальнейшим превращениям подвергаются в основном в печени. Если же концентрация этанола в перфузируемой жидкости превышает 16 мМ, то до 60% ацетальдегида удаляется из печени в неметаболизированном виде и в условиях *in vivo* в периферические ткани. Токсические явления, наблюдаемые при алкогольном отравлении в значительной степени обусловлены как раз этим обстоятельством, поскольку внепеченочный метаболизм ацетальдегида гораздо менее интенсивен и выше риск проявления токсического действия этого продукта окисления этанола, особенно на ткани мозга. Кстати, именно на токсическом эффекте ацетальдегида основано

применение лекарственного препарата — дисульфирама (синонимы: дисульфид тетраэтилтиурама, антабус), сильного ингибитора ацетальдегиддегидрогеназы, для создания стойкого отвращения к алкоголю у больных хроническим алкоголизмом. Ацетальдегид в основном окисляется в печени с образованием ацетата. Этот процесс происходит преимущественно в митохондриях, так как около 80% НАД-зависимой ацетальдегиддегидрогеназы находится в матриксе митохондрий, и лишь незначительная часть клеточного содержания этого фермента приходится на долю цитоплазмы. Образующийся ацетат является естественным субстратом клеточных ферментов и одним из ключевых метаболитов в обмене углеводов, жиров и белков. Соединение ацетата с коферментом А создает благоприятные условия для его дальнейшего метаболизма либо путем окисления в митохондриях печени и других тканей в цикле Кребса, либо путем включения во многие биосинтетические реакции. Взаимоотношения этанола с окислительными системами клетки схематично представлены на рис. 21.



жениям в клетках для их (вернее, вследствие резкого токсического альдегиддегидрогеназного) влечения этих эндогенных сульфидных групп в ацетат, который приводит к разрушению нор-

шениям в клетках и тканях: 1) образование избыточного для клетки количества восстановленного НАД⁺ (вернее, увеличение отношения НАДН/НАД⁺) и как следствие резкая диспропорция в эндогенных окислительно-восстановительных процессах; 2) образование токсичного ацетальдегида; 3) насыщение алкоголь- и альдегиддегидрогеназ этанолом и ацетальдегидом и отвлечение этих ферментов от нормального метаболизма эндогенных субстратов, содержащих спиртовые и альдегидные группы; 4) накопление в избыточных количествах ацетата, что при наличии восстановительных условий приводит к чрезмерному накоплению жиров и нарушению нормального жирового обмена.

Теперь обсудим работы, в которых отражены различные нарушения, вызываемые в организме животных и человека при однократном и хроническом введении этанола или в условиях *in vitro* на изолированных препаратах клеточных органелл, чтобы реально представить себе фактическое проявление эффектов этанола, описанных выше.

Как уже указано, потребление алкоголя вызывает значительное увеличение редокс-состояния пиридиннуклеотидов в печени. Избыток восстановительных эквивалентов в цитоплазме может окисляться в митохондриях, но для НАДН митохондриальная мембрана почти непроницаема, и поэтому существуют так называемые челночные системы (шунты), при помощи которых восстановительные эквиваленты передаются в митохондрии, где происходит быстрое окисление с соответствующим энергетическим выигрышем. Не приводит ли хроническая алкоголизация к усилению работы этих челночных систем?

Этот вопрос был исследован А. J. Cederbaum и соавт. (1973). Оказалось, что малат-аспартатный, α -глицерофосфатный и жирнокислотный шунты не активируются при алкоголизации. Следовательно, митохондрии не способны к адаптивному увеличению окисления цитоплазматического НАДН. Более того общая митохондриальная цитохромоксидазная и сукцинатдегидрогеназная активность снижаются как при однократном введении больших доз этанола [Елецкий Ю. К., 1968], так и при длительной алкоголизации [Rubin E. et al., 1970; Cederbaum A. J., Rubin E., 1975]. Другие авторы [Bernstein J. D., Penniall R., 1978] также показали уменьше-

ние активности дыхательной цепи митохондрии как с НАД-зависимыми субстратами, так и с сукцинатом.

При исследовании состава дыхательной цепи в митохондриях печени алкоголизированных в течение 30—60 сут крыс оказалось, что в них значительно снижается содержание цитохромов $a+a_3$ и b , что и является причиной уменьшения окислительной активности митохондрий. На изолированных препаратах митохондрий, полученных от неалкоголизированных животных, изучали непосредственное действие этанола на окисление. В концентрациях 40—100 мМ этанол не оказывал существенного влияния на окисление субстратов [Yeh J. Z., Byington K. H., 1973] и вызывал некоторое ингибирование только в концентрации около 200 мМ [Wand H., Basigalupo G., 1966], а ацетальдегид ингибировал митохондриальное дыхание в концентрации 5 мМ только при окислении НАД-зависимых субстратов [Yeh J. Z., Byington K. H., 1973]. В связи с этим интересно отметить, что введение этанола в течение 1 мес снижает эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях только при окислении НАД-зависимых субстратов, а в экспериментах на изолированных митохондриях контрольных крыс ацетальдегид, но не этанол, также ингибировал *in vitro* окислительное фосфорилирование, связанное с первым пунктом сопряжения (НАДН-дегидрогеназный участок) в дыхательной цепи [Cederbaum A. J. et al., 1974; Cederbaum A. J., Rubin E., 1975]. На основании этих данных предполагается, что нарушение окислительного фосфорилирования, наблюдаемое при однократном [Елецкий Ю. К., 1972] и хроническом введении алкоголя [Cederbaum A. J. et al., 1974] связано с непосредственным действием ацетальдегида, а не этанола, и это, по-видимому, является одним из механизмов токсического действия алкоголя на организм. W. S. Thayer и E. Rubin (1979) провели изучение нарушения окислительного фосфорилирования при длительной алкоголизации на препаратах субмитохондриальных частиц, приготовление которых связано с процедурами, исключаящими влияние каких-либо эндогенных факторов, не связанных с мембранами, при измерении параметров окисления и фосфорилирования, в частности исключается нахождение в препаратах этанола или ацетальдегида, присутствующих в печени после введения алкоголя. Тем не менее в этих

эксперимента
дана, приче
зависимых суб
дыхательного
некоторых э
нее содержа
Все это
лизации про
роятности, в
лидов и бел
ствительно,
ние длитель
как синтеза
так и изме
[Hosoun E.
обусловлива
мембран, с
работы меха
изменения с
ной алкоголь
зависимой
(1977).

При срав
синтез белк
ацетальдегид
этот процесс
Как уже
вычайно вы
в нефермен
ными амина
и β -карболи
альдегиддег
ношению к
обмена, в
биогенных
гид, реагиру
ролин, стру
ции могут
фармакологи
они ответств
коголя [Sol
конденсаци
сходные с
зываются с

экспериментах также показано снижение скорости дыхания, причем в большей степени при окислении НАД-зависимых субстратов, уменьшение эффективности окислительного фосфорилирования, активности АТФ-азы и некоторых эндэргонических реакций, а также уменьшение содержания цитохромов $a+a_3$.

Все это говорит о том, что при длительной алкоголизации происходят глубокие изменения, по всей вероятности, в структуре мембран, в синтезе фосфолипидов и белков, участвующих в их построении. Действительно, обнаружено, что введение этанола в течение длительного времени сопровождается снижением как синтеза белков в митохондриях [Rubin E., 1973], так и изменением фосфолипидного состава мембран [Hosein E. A. et al., 1977; Littleron J. M., 1979]. Это обуславливает изменение прочности и проницаемости мембран, с чем связано уменьшение эффективности работы механизма сопряжения. Подобная корреляция изменения свойств мембран митохондрий при длительной алкоголизации с изменением активности магний-зависимой АТФ-азы показана Е. А. Hosein и соавт. (1977).

При сравнении действия этанола и ацетальдегида на синтез белка в митохондриях *in vitro* оказалось, что ацетальдегид в 1000 раз более эффективно ингибирует этот процесс, чем этанол [Burke J. P., Rubin E., 1979].

Как уже сообщалось, ацетальдегид обладает чрезвычайно высокой реакционной способностью и вступает в неферментативную реакцию конденсации с биогенными аминами с образованием тетрагидроизохинолинов и β -карболинов. Кроме того, ацетальдегид занимает альдегиддегидрогеназу и снижает ее активность по отношению к эндогенным субстратам нейромедиаторного обмена, в результате чего недоокисленные продукты биогенных аминов, например диоксифенилацетальдегид, реагируют с аминами, образуя тетрагидропапаверолин, структурно сходный с морфином. Все эти реакции могут протекать в мозге. Образующиеся продукты фармакологически активны; предполагают, что именно они ответственны за возникновение зависимости от алкоголя [Collins M. A., Bigdeli M. G., 1975]. Продукты конденсации альдегида с моноаминами, структурно сходные с опиатами, по-видимому, специфически связываются с некоторыми типами опиатных рецепторов

в мозге, поскольку палоксон уменьшает глубину наркоза, вызываемого алкоголем [Blum K. et al., 1977]. Кроме того, образующиеся эндогенные алкалоиды затрудняют разрушение биогенных аминов, препятствуют обратному транспорту их в нервных окончаниях и значительно затрудняют их выброс. Следовательно, независимо от того, вызывают ли продукты конденсации ацетальдегида и биогенных аминов формирование зависимости от алкоголя или нет, бесспорным остается факт нарушения процессов синаптической передачи в ЦНС под влиянием этих веществ, а следовательно, и ее функций.

Еще одним существенным последствием употребления больших количеств алкоголя является накопление в клетках продукта окисления ацетальдегида — ацетата. В основном процесс окисления ацетальдегида происходит в митохондриях и при этом наряду с образованием ацетата значительно увеличивается отношение окислительно-восстановительной пары НАДН/НАД⁺ (так же как и при окислении этанола в цитоплазме). Нормальное окисление жирных кислот в митохондриях требует окисленного пиридиннуклеотида; следовательно, в условиях алкогольной интоксикации этот процесс заторможен. В то же время синтез жирных кислот протекает со значительно большей скоростью, поскольку и ацетат, и НАДН в достаточной концентрации присутствуют в митохондриях. Более того, в результате окисления НАДН в митохондриях образующийся АТФ тратится на образование ацетил-КоА (с этого начинается процесс биосинтеза жирных кислот) и, таким образом, энергия окисления преимущественно расходуется в этой реакции, что снижает возможность использования ее в других требующих энергии метаболических процессах, т. е. налицо условия фактической деэнергизации ткани.

В цитоплазматической сети также наблюдается при алкоголизации усиление биосинтеза триглицеридов, фосфолипидов и накопление холестерина. Все это в конечном итоге при длительной алкоголизации приводит к ожирению печени — явлению, хорошо известному и характерному для больных алкоголизмом. Здесь мы лишь схематично рассмотрели влияние введения этанола на жировой обмен. Этот аспект проблемы достаточно сложен и интенсивно изучается. Более подробно он изло-

жен в обзоре E. Vargaona и C. S. Lieber (1979). Отметим только, что изменение жирового обмена сопровождается существенным изменением в липидной структуре мембран, изменением их состава и некоторых физико-химических свойств.

В обзоре J. M. Littleton (1979) в сравнительном аспекте рассмотрены изменения мембранных структур митохондрий, синапсом, эритроцитов и цитоплазматического ретикулума при развитии толерантности и зависимости от алкоголя, а также влияние однократного введения этанола на мембраны. Кроме того, подчеркнута физиологическая значимость и общность действия этилового спирта на разные виды мембран и связь этих изменений с функциональными нарушениями тех или иных структур. В результате действия этанола и ацетальдегида на мембраны изменяется проницаемость мембран для катионов и для эндогенных молекул-регуляторов: например, в мембранах нейронов нарушается процесс транспорта нейромедиаторов.

Длительное введение этанола, как уже отмечалось, приводит к усилению его метаболизма в печени в основном за счет индукции микросомальной, связанной с цитохромом Р-450 окислительной системы. Изменение активности этой системы в то же время имеет более широкие последствия, чем просто ускорение метаболизма этилового спирта. Введение низких доз этанола (10—25 мг/кг) в течение 3 сут стимулирует микросомальную оксидазу со смешанной функцией без увеличения уровня цитохрома Р-450 и не влияет на элиминацию из плазмы крови крысы пентобарбитала [Ioannides C. et al., 1975]. Предполагается, что в этом случае этанол активирует НАДФН-цитохром с-редуктазу, по-видимому, благодаря увеличению концентрации субстрата НАДФН. Более длительное и в больших дозах введение алкоголя приводит к увеличению не только активности микросомальной системы гидроксилирования, но и к возрастанию содержания цитохрома Р-450, а также к снижению эффективности действия многих фармакологических агентов [Linnoila M. et al., 1979]. В этом случае алкоголизация активирует неспецифическую (или относительно неспецифическую) микросомальную систему окисления, метаболизирующую чужеродные вещества и тем самым увеличивающую толерантность ко многим лекарственным соединениям (яв-

ление перекрестной толерантности). Однако при введении, например, барбитуратов на фоне введения алкоголя даже после индукции микросомальной монооксигеназной системы происходит, наоборот, увеличение токсичности барбитуратов. Это объясняют тем, что этанол насыщает цитохром Р-450 и препятствует метаболизму других субстратов микросомальной оксидазы, т. е. способствует сохранению высокой концентрации токсического агента в организме.

Наконец, рассмотрим состояние этанолокисляющих систем при хроническом поступлении этанола в организм. В экспериментах на животных и у человека показано, что хроническое воздействие алкоголя сопровождается увеличением способности печени метаболизировать этанол. В результате этого скорость исчезновения из крови алкоголя увеличивается и многие фармакологические (токсические) эффекты алкоголя либо нивелируются, либо продолжительность их уменьшается [см. обзор Mendelson J. H., 1971]. Однако механизм этого явления до настоящего времени не во всем ясен. При хронической алкоголизации скорость окисления этанола в печени за счет АДГ может увеличиваться, но при этом необходима регенерация НАД⁺, которая происходит в митохондриях, а для этого процесса в свою очередь нужен аденозиндифосфат. Считают, что увеличение скорости поступления АДФ в митохондрии обеспечивается стимуляцией Na⁺-K⁺-АТФ-азы в условиях алкоголизации, что показано в некоторых исследованиях [Thürman R. G., et al., 1976]. Как уже указано выше, превращение основной массы поступившего в организм этанола происходит в печени. Учитывая чрезвычайно малую активность АДГ мозга, можно утверждать, что мозг в метаболизме этанола существенного участия не принимает. Однако, принимая во внимание имеющиеся данные, что активность АДГ мозга по мере алкоголизации возрастает, можно предположить, что АДГ мозга определяет чувствительность ЦНС к этанолу и, в частности, толерантность. Это подтверждается экспериментальными работами, в которых показано, что у крыс, потребляющих 15% раствор этанола в качестве единственного источника питья, активность АДГ мозга через 2 нед увеличивается вдвое и продолжает увеличиваться по мере дальнейшей алкоголизации. В то же время активность АДГ печени, а также

тегиддег
на протяжении
эксперимента
АДГ мозга
т. е. наблюд
эффектам э
К настоя
ных, свидет
печени в пр
Cederbaum
коголя не св
носа восста
Уменьшение
но обусловл
ской алкого
ния механиз
нию, данны
активность
счет «освоб
[Sze P. J.,
лазы позвол
ние алкогол
ления этано
окисления с
чения актив
данных об
поступлении
растании р
о чем указ
Общие э
на метабол
вали метаб
опиатов, ба
было уделе
ские процес
из них, ко
сильно реак
В каждом
раскрываю
ханизм дей
попытаемс
ходимые, п
Все три
ны наруша

альдегиддегидрогеназа печени и мозга не изменялись на протяжении этих сроков алкоголизации. В этих же экспериментах показано, что с увеличением активности АДГ мозга снижаются токсические эффекты алкоголя, т. е. наблюдается развитие толерантности к некоторым эффектам этанола [Raskin N. H., 1973].

К настоящему времени накоплено достаточно данных, свидетельствующих о снижении активности АДГ печени в процессе длительной алкоголизации [Rubin E., Cederbaum A. J., 1974], и увеличение метаболизма алкоголя не связано с активацией челночных систем переноса восстановительных эквивалентов в митохондриях. Уменьшение активности АДГ по крайней мере частично обусловлено снижением уровня НАД⁺ при хронической алкоголизации. Чрезвычайно важны для объяснения механизма абстинентных состояний, по нашему мнению, данные о том, что в период лишения алкоголя активность АДГ возрастает на 60%, по-видимому, за счет «освобождения» механизмов образования НАД⁺ [Sze P. J., 1977]. Изучение активности МЭОС и каталазы позволило установить, что хроническое потребление алкоголя увеличивает активности этих путей окисления этанола за счет стимуляции НАДФН-зависимого окисления с образованием перекиси водорода и увеличения активности каталазы. Существует также немало данных об индукции МЭОС в печени при хроническом поступлении этанола в организм и о существенном возрастании роли этой системы в метаболизме алкоголя, о чем указывалось выше.

Общие замечания о механизме действия наркотиков на метаболизм. В настоящей главе мы проанализировали метаболические эффекты трех типов наркотиков: опиатов, барбитуратов и этанола. Основное внимание было уделено влиянию этих веществ на метаболические процессы в печени, причем преимущественно на те из них, которые максимально уязвимы или наиболее сильно реагируют на поступление в клетки наркотиков. В каждом случае мы старались представить данные, раскрывающие или предполагающие определенный механизм действия наркотиков на эти системы. Теперь же попытаемся подвести некоторые итоги и сделать необходимые, на наш взгляд, обобщения.

Все три типа рассматриваемых соединений способны нарушать в клетке основную, дающую энергию про-

дессе — окислительное фосфорилирование. Достаточно подробно исследован механизм их действия на митохондрии *in vitro*, и есть основания полагать, что подобные эффекты могут реализоваться в условиях *in vivo*. При этом, как правило, таким действием на intact-ные клетки или ткани наркотики могут обладать только при однократном введении субмаксимальных или максимальных доз (токсический эффект). Общий конечный результат — ингибирование окислительного фосфорилирования достигается, однако, разными препаратами при помощи неодинаковых механизмов. Для опиатов механизм нарушения этого процесса заключается в ингибировании транспорта адениннуклеотидов через митохондриальную мембрану и в индукции проницаемости мембран для K^+ ; для барбитуратов — это ингибирование переноса электронов на уровне НАДН-дегидрогеназы дыхательной цепи митохондрий, возможно еще и разобщение окисления и фосфорилирования; а для этанола, вернее, для его основного метаболита — ацетальдегида, торможение переноса электронов и нарушение механизма сопряжения в первом пункте дыхательной цепи. Знание механизма токсического действия наркотиков в отношении хотя бы одной, но существенной метаболической системы, какой является митохондриальная система окислительного фосфорилирования, дает нам неоспоримые преимущества в поисках средств лечения или предотвращения интоксикации наркотиками.

Следует отметить, что большинство токсических эффектов наркотиков, которые обнаружены при однократном введении, ослабляются или исчезают после хронического применения препарата. В этом проявляется природа естественных защитных сил организма, которые перестраивают метаболизм таким образом, что происходит адаптация к новым условиям, включение компенсаторных механизмов (например, индукция микросомальной гидроксилазной системы и цитохром b_5 -шунта при барбитуратных наркоманиях или МЭОС при хроническом введении алкоголя). Однако такие перестройки бесследно не проходят для организма; одной из систем, подвергавшихся существенным изменениям, является связанная с цитохромом Р-450 оксигеназа со смешанной функцией в цитоплазматической сети печени.

Все рассмо-
дере влияют
этой системы.
набинонды с
гидроксилазы
ситураты и а
чивают эти
В то же врем
меняют норм
тов этой сист
сыщенных жи
модифицирова
паратов, чем
рантности ба
типиринов и
тов, или ис
ность) барби
других опиом

Кроме то
как индукция
системы эндо
нием свойс
субстратную
аспекту проб
По-видимому
тохрома Р-4
фармакологи
лазную систе
этого цитохр
метаболизма
ществ. Вполн
тельного при
шении колич
связано с изм
цитохрома Р
ственных за

И, након
ханизме дейс
Все эти веще
через биолог
взаимодейств
ва: текучест
белково-липи
же состав м

Все рассмотренные типы наркотиков в той или иной мере влияют на активность и содержание ферментов этой системы. Морфин и его производные, а также канбиноиды снижают как активность микросомальной гидроксилазы, так и количество цитохрома Р-450, а барбитураты и алкоголь при хроническом введении увеличивают эти параметры микросомального окисления. В то же время и те, и другие эффекты, во-первых, изменяют нормальный метаболизм эндогенных субстратов этой системы (гидроксилирование стероидов, ненасыщенных жирных кислот и т. д.), а, во-вторых, могут модифицировать действие других лекарственных препаратов, чем объясняется явление перекрестной толерантности барбитуратов, алкоголя, фенотиазинов, антипиринов и ряда других фармакологических препаратов, или непереносимость (индуцированная токсичность) барбитуратов и алкоголя у морфинистов или других опиоманов.

Кроме того, при длительном введении наркотиков как индукция, так и ингибирование гидроксилазной системы эндоплазматической сети сопровождается изменением свойств цитохрома Р-450, обуславливающих его субстратную специфичность. В последнее время этому аспекту проблемы придается все большее значение. По-видимому, не только и не столько количеством цитохрома Р-450 определяется эффект того или иного фармакологического препарата, изменяющего гидроксилазную систему. Именно изменение соотношения форм этого цитохрома в печени ответственно за изменение метаболизма как эндогенных, так и вводимых извне веществ. Вполне вероятно, что известное последствие длительного приема наркотиков, выражающееся в уменьшении количества тестостерона в плазме крови, прямо связано с изменением наркотиками свойств (или форм) цитохрома Р-450 в печени и в других органах, ответственных за метаболизм андрогенов.

И, наконец, укажем еще один общий момент в механизме действия наркотиков рассматриваемых типов. Все эти вещества липидорастворимы, легко проникают через биологические мембраны, а главное, эффективно взаимодействуют с мембранами и изменяют их свойства: текучесть, объем, избирательную проницаемость, белково-липидные взаимоотношения в мембране, а также состав мембран, изменяющийся в основном в ре-

зультате влияния наркотиков на метаболизм фосфолипидов, что показано для многих биологических мембран при хроническом введении как этанола, так и барбитуратов, опиатов и каннабиноидов. Механизм нарушения наркотиками разных типов фосфолипидного метаболизма различен, но конечный результат — изменение состава и функции мембран — однозначно определяет и изменение многих мембрано-связанных ферментов, в частности АТФ-азы, переносчиков электронов в митохондриальных и микросомальных цепях, а также транслоказы анионов и катионов.

В связи с этим стоит упомянуть о роли Са в эффекте наркотиков. Одной из важнейших функций этого катиона является его причастность к регуляции ионной проницаемости мембран. В митохондриях Ca^{2+} регулируют проницаемость мембран для K^+ , который, по-видимому, в свою очередь является регулятором окислительного фосфорилирования, в синаптических и нейрональных мембранах потоки K^+ и Na^+ также могут регулироваться несвязанным Ca^{2+} ; сокращение мышц строго зависит от кальция зависимой АТФ-азы. И на все эти процессы существенный эффект оказывают наркотики именно благодаря антагонистическим взаимодействиям с Ca^{2+} . Механизм подобного антагонизма для разных наркотиков различен: опиаты и продукты конденсации ацетальдегида и биогенных аминов конкурируют с Ca^{2+} за анионные участки фосфолипидов в силу их липидорастворимости и наличия положительного заряда. Кроме того, для взаимодействия с мембранами, видимо, важна некоторая стерическая компонента в молекуле спирта. Барбитураты как вещества анионной природы, вероятно, изменяют, внедряясь в мембрану, конформацию фосфолипидов, связывающих Ca^{2+} , и тем самым препятствуя иммобилизации Ca^{2+} на мембране (конкретный механизм этих взаимодействий еще предстоит выяснить); однако факт увеличения свободной концентрации Ca^{2+} в примембранном слое (в клетках или в изолированных органеллах) не вызывает сомнения. Следствием этого является активация фосфолипазы, продукты ферментативной деятельности которой и вызывают изменение проницаемости биологических мембран для моновалентных катионов.

гл
ГЕ
ТС
По
механизма
личных б
выраженн
организма
нотипичес
прос: на
имодейств
ется ген
шенство
трудности
чувствите
стоящее
ющий от
доть важ
вании ти
характер
лигенный
низма к
новлен
априори
дивидуум
ва Н. Н.
репы за
перимент
включая
Опиат
гической
инбредны
в этой об
ствительн
ну, герои
ционный
ности опи

Глава 6

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПАТОГЕНЕЗА ТОКСИКОМАНИИ

По мере углубления знаний о биохимических механизмах формирования реакции на наркотик у различных биологических объектов стало очевидным, что выраженная вариабельность индивидуального ответа организма при прочих равных условиях связана с генотипическими особенностями. Возник естественный вопрос: на какой стадии многоступенчатого процесса взаимодействия наркотика с живой клеткой осуществляется генетический контроль? К сожалению, несовершенство методологических подходов и технической трудности при исследованиях генетических механизмов чувствительности у млекопитающих не позволяют в настоящее время дать на него однозначный и исчерпывающий ответ. Тем не менее уже сейчас удалось подтвердить важную роль генетических факторов в формировании типа реакции организма на наркотик и оценить характер ее наследования. Кроме того, обнаружен полигенный механизм контроля чувствительности организма к препаратам, вызывающим пристрастие, и установлен ряд биологических маркеров, позволяющих априори судить о качестве и выраженности реакции индивидуума на наркотик [Майский А. И., Ведерникова Н. Н., 1979]. В этой связи в данной главе рассмотрены закономерности контроля чувствительности экспериментальных животных к различным соединениям, включая опиаты, барбитураты и алкоголь.

Опиаты. Большинство исследований по фармакологической генетике опиатов выполнено на стандартных инбредных линиях мышей и крыс. Уже первые работы в этой области выявили выраженные различия в чувствительности экспериментальных животных к морфину, героину и другим алкалоидам этой группы. Традиционный подход к изучению фармакологической активности опиатов был сохранен и при анализе генетиче-

ских различий в чувствительности биологических объектов: в качестве стандартных критериев, как правило, избирались тесты болевой чувствительности и локомоторной активности. Максимально реактогенными к опиятам по тесту локомоции оказались мыши линии C57BL/6, а линии DBA/2 были, напротив, практически резистентны к этому эффекту морфина; у мышей линии BALB/c обнаружена промежуточная реакция. Характерно, что действие наркотика на животных чувствительных линий имело дозозависимый характер [Oliverio A., Castellano C., 1974].

Подвижность интактных животных отличалась почти у всех обследованных линий, причем мыши линии C57BL/6 с наибольшим исходным значением локомоторной активности давали максимальную реакцию на морфин по этому тесту [Edelberg E. et al., 1975]. Динамика двигательной активности после введения возрастающих доз морфина имела одинаковую направленность, варьируя лишь количественно. В графическом изображении кривая изменения локомоции мышей линии BALB/c и C57BL/6 носила однофазный характер с пиком через 75 мин после введения препарата. Максимальные различия в чувствительности между этими линиями определялись в интервале 60—90 мин.

Генетически контролируемая чувствительность мышей к обезболивающему эффекту морфина четко показана на примере линии C57BL/6 и DBA/2. Несмотря на близкие значения латентного периода болевой чувствительности у интактных животных этих линий, выраженность ответной реакции на введение наркотика резко варьировала при определении методом горячей пластинки. Анальгезирующий эффект морфина возрастал у мышей всех линий при увеличении дозы наркотика от 5 до 10 мг/кг, будучи максимальным у мышей линии BALB/c; при дозе 20 мг/кг реакция мышей линии BALB/c и DBA/2 была одинаковой. Интенсивность ответа мышей C57BL/6 возрастала пропорционально увеличению дозы наркотика, но при этом на максимуме она была существенно ниже, чем у BALB/c и DBA/2 [Castellano C., Oliverio A., 1975].

Как показали опыты с F₁-гибридами, полученными от скрещивания мышей чувствительных и резистентных линий, анальгетическая и локомоторная реакция F₁-гибридов C57BL/6×BALB/c и C57BL/6×DBA/2 на мор-

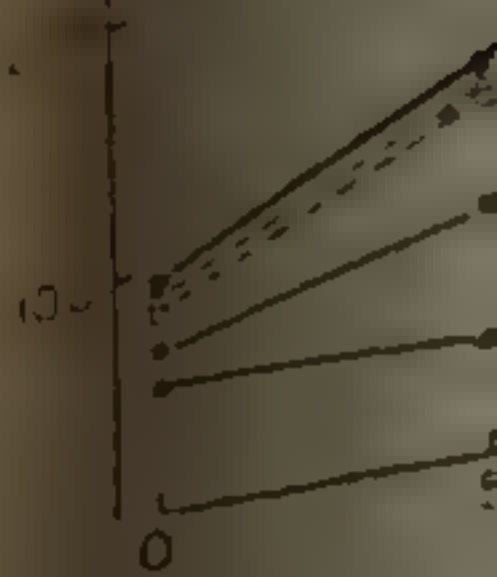


Рис. 22. Вл
реакцию тре
На оси абсцисс
ло локомоторн
инбредные ли

фин соотв
Следовате
тик по об
тичным д

Оригин
чувствите
бинантно
вания мь
щего инб
не содер
дительно
мутаций,
дая из
комбина
рекомбин
BALB/c
ния род
использо
ческого
щих пос
фина. П
инбредн
мышей
Очевидн
взаимоде
ла гено
по Н-ген
ка прот
этим ген
одними

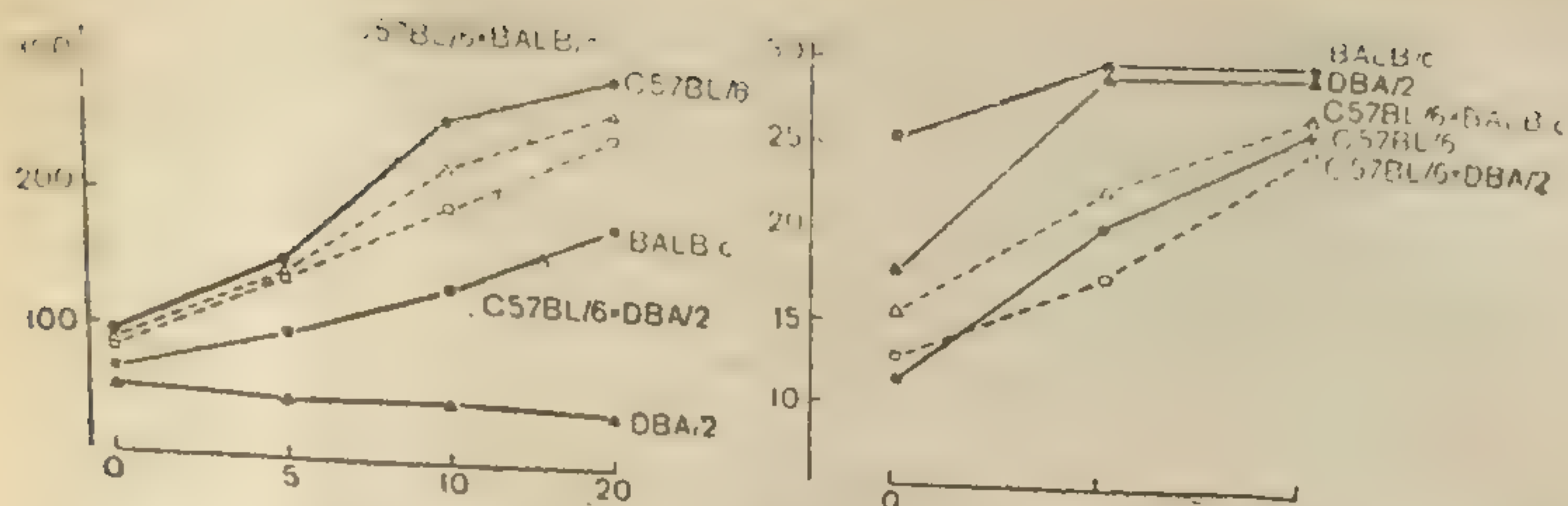


Рис. 22. Влияние морфина на двигательную (I) и болевую (II) реакцию трех линий мышей и их F_1 -гибридов. На оси абсцисс — I и II — дозы морфина (мг/кг); на оси ординат: I — число локомоций; II — болевая реакция (с). Сплошная линия — стандартные инбредные линии; штриховая линия — F_1 -гибриды.

фин соответствовала таковой у мышей линии C57BL/6. Следовательно, наследование типа реакции на наркотик по обоим тестам характеризуется полным или частичным доминированием линии C57BL/6 (рис. 22).

Оригинальной генетической моделью для изучения чувствительности мышей к наркотикам являются рекомбинантно-инбредные линии, выведенные путем скрещивания мышей линии BALB/c и C57BL/6 и последующего инбридинга. Эти линии интересны тем, что они не содержат никаких новых генов по сравнению с родительскими линиями, кроме возможных нескольких мутаций, возникших за время выведения. Однако каждая из рекомбинантно-инбредных линий несет новую комбинацию генов, полученных от родителей. Семь рекомбинантно-инбредных линий, родительские линии BALB/c и C57BL/6, а также F_1 -гибриды от скрещивания родительских линий в двух направлениях были использованы как модель для количественного генетического анализа специфических эффектов, возникающих после однократного и хронического введения морфина. Показано, что родительские и рекомбинантно-инбредные линии различаются по исходному поведению мышей в тестах и по чувствительности к наркотику. Очевидно, в обоих случаях имеет место аддитивное взаимодействие, по-видимому, довольно большого числа генов. Поскольку характеристика исходных линий по H-генам достаточно хорошо изучена, сделана попытка протипировать рекомбинантно-инбредные линии по этим генам с целью обнаружения корреляции между одними или несколькими H-генами и выраженностью

поведенческих реакций при введении морфина. Для этого были использованы конгенные (по H-генам) линии мышей, выведенные от скрещивания линии C57BL/6 и BALB/c. Установлено, что H-гены не принимают участия в регуляции чувствительности мышей к наркотикам [Shustere L. et al., 1975].

Удельный вес генетических детерминант и факторов окружающей среды в контроле типа реакции животных на морфин был установлен при помощи фармакологического тестирования бэкроссов: (C57BL/6 × BALB/c) × C57BL/6; (C57BL/6 × BALB/c) × BALB/c, а также (C57BL/6 × DBA/2) × C57BL/6, (C57BL/6 × DBA/2) × DBA/2. Эксперименты, проведенные на бэкроссах указывают, что наиболее значимой для проявления сильной или слабой реакции на наркотик является генетическая компонента. Поскольку одни и те же бэкроссные мыши были последовательно типированы сначала на локомоторную, а через 30 мин после этого на болевую реакцию, с большой достоверностью удалось определить степень корреляции между этими двумя признаками. Проведенные математические расчеты показали, что существует негативная корреляция между аналгетическим эффектом и локомоторным поведением морфинизированных мышей. Диссоциация чувствительности инбредных линий по отношению к двум разным эффектам морфина позволила постулировать наличие двух или более генетических детерминант, независимо друг от друга участвующих в регуляции ответа мышей на опиаты [Castellano C., Oliverio A., 1975]. Однако вывод о наличии негативной корреляции по отношению к двигательному и обезболивающему эффектам морфина был опровергнут L. Shuster и соавт. (1975). Не считая метод «горячей пластинки» оптимальным, так как он не позволяет исключить влияния скорости передвижения животного на время болевой реакции, авторы сочли более адекватной методику, при которой болевой стимул наносится на хвост. Изучение влияния различных доз морфина на болевую чувствительность, определяемую подобным образом, позволило сделать вывод, что обезболивающий эффект наркотика несколько выше у мышей C57BL/6 по сравнению с BALB/c. Таким образом, вопрос о чувствительных и резистентных к морфину линиях, выявляемых по аналгетическому тесту, в настоящее время остается открытым и во многом зависит

от споро
гоятно
тическо
на мор
постан
ствие

Эле
денные
в кору
различ
линии
вотных
и в пе
ной ин
C57BL
животн
ческих
нялись
му мор
линий
ствую
на мор
наблюд
торную
но сни
линий,
активно
сторон
вании
гой — у
фининд

Гене
(5 мг/к
ратуру
крысах
gue-Da
дозах
термич
В то
у крыс
дозы н
вотных
животн

от способов регистрации болевой чувствительности. Вероятно, оба подхода пригодны для сравнительного генетического анализа межлинейных различий в реакциях на морфин, но, очевидно, в неодинаковых методических постановках конечный результат определяет взаимодействие неоднозначных генетических детерминант.

Электроэнцефалографические исследования, проведенные на мышах с имплантированными электродами в кору головного мозга, определили принципиальные различия в характере изменений, выявленных у мышей линии C57BL/6 и DBA/2. Тип ЭЭГ был идентичен у животных обеих линий как во время бодрствования, так и в период сна. Однако через 10 мин после однократной инъекции морфина характер ЭЭГ у мышей линии C57BL/6 становился идентичным таковому у спящих животных (повышение вольтажа, появление специфических медленных волн сна). Данные изменения сохранялись в течение 45—60 мин. В противоположность этому морфин не модифицировал данных ЭЭГ животных линий DBA/2, которые соответствовали таковым у бодрствующих мышей. Напомним, что аналогичная реакция на морфин (высокая — у C57BL/6 и низкая — у DBA/2) наблюдалась и при тестировании животных на локомоторную активность. Септальные поражения существенно снижали аналгетическую реакцию у животных обеих линий, но не влияли на электрическую и двигательную активность мышей линии C57BL/6. Эти данные, с одной стороны, свидетельствуют о генетическом детерминировании электроэнцефалографических изменений, а с другой — указывают на участие септальных полей в морфининдуцированной аналгезии, но не локомоции.

Генотипзависимые вариации в действии низких (5 мг/кг) и высоких (40 мг/кг) доз морфина на температуру тела были показаны В. Сох и соавт. (1979) на крысах стандартных инбредных линий Wistar и Sprague-Dawley. Было установлено, что наркотик в малых дозах вызывал гипотермический, а в высоких — гипертермический эффект у крыс линии Sprague-Dawley. В то же время действие морфина на этот признак у крыс линии Wistar было однозначным: независимо от дозы наркотик повышал температуру тела у этих животных. Тем не менее чувствительность к налоксону у животных обеих линий была идентичной, так как анта-

гошист обращал все термические эффекты морфина, но не влиял на способность животных противостоять действию холодового и теплового стресса.

Таким образом, сочетанное применение большого набора фармакологических тестов для изучения генетически контролируемой восприимчивости животных к опиатам позволило выявить неоднозначные закономерности в типе и динамике развития ответной реакции мышей и крыс инбредных линий. Это в свою очередь предполагает полигенность контроля поведенческих реакций, индуцированных введением морфина и, следовательно, указывает на наличие множественных биохимических механизмов, опосредующих данный генетический контроль.

В последние годы проводятся многочисленные экспериментальные исследования, направленные на идентификацию биохимических субстратов, генетически контролируемое содержание которых определяет наличие или отсутствие важнейших специфических эффектов наркотических веществ. Открытие в синапсах нервных клеток опиатных рецепторов и их природных пептидных лигандов предопределило изучение генотипзависимых различий этих параметров. Положительную, но статистически недостоверную корреляцию между уровнем стереоспецифического связывания [^3H]-налоксона в гомогенатах мозга и выраженностью болевой реакции по методу «отдергивания хвоста» у мышей линий BALB/c и C57BL/6, а также их F_1 -гибридов и шести рекомбинантно-инбредных линий нашли А. Ваган и соавт. (1975). У мышей рекомбинантно-инбредной линии СХВК с минимальной аналгетической реакцией на морфин было обнаружено самое низкое связывание [^3H]-налоксона (609 имп в 1 мин/мг белка) по сравнению с другими линиями (844—1044) с высоким коэффициентом корреляции. Различное связывание, по мнению этих авторов, не определяется вариабельностью сродства рецепторов: у мышей генетически разнородных линий неодинаковое число связывающих мест.

Другие исследователи не нашли связи между уровнем опиатных рецепторов и выраженностью аналгетической реакции [Eidelberg E. et al., 1975]. А. Ваган и соавт. (1975) относят эти противоречия за счет использования неадекватного (с их точки зрения) поставленной задаче метода «горячей пластинки». Анализ

закономерностей специфического связывания [^3H]-налоксона в препаратах гомогената мозга мышей линии C57BL/6 и DBA/2 показал наличие большого числа связывающих мест для антагониста, но не для [^3H]-дигидроморфина.

Частично очищенный эндогенный морфиноподобный фактор полностью вытеснял [^3H]-дигидроморфин из его комплекса с рецептором, выделенным из мозга мышей как чувствительных, так и резистентных линий [Coda E. E. et al., 1976]. Таким образом, ни аффинитет рецепторов к морфину или эндогенному морфиноподобному соединению, ни число рецепторов в достаточной мере не могут объяснить различия более чем в 2 раза чувствительности к морфину у этих линий мышей. Возможно, что определение различий в связывании меченых агонистов и антагонистов не в гомогенате целого мозга, а в отдельных его участках, особенно в лимбической системе, позволяет выявить более четко роль опиатных рецепторов в выраженности анальгетической реакции.

Линейные различия в сорбции, метаболизме и проницаемости опиатов через гематоэнцефалический барьер до сих пор не изучены, так как считается, что наличие негативной связи между чувствительностью мышей по тесту анальгезии и двигательной активностью полностью исключает возможность влияния метаболических вариаций. С нашей точки зрения, подобный вывод нуждается в пересмотре, так как возможно существование нескольких типов или конформации опиатного рецептора, взаимодействующего с различными функциональными группами в молекуле морфина, метаболизирующихся с различной скоростью.

Многочисленные исследования значимости нейромедиаторных систем для проявления эффектов морфина позволили заключить, что для проявления анальгетического и локомоторного действия наркотика в различной степени необходим определенный уровень ацетилхолина, катехоламинов, серотонина и дофамина.

Анализ кругооборота норадреналина у чувствительных к стимулирующему двигательную активность действию морфина мышей линий BALB/c, C57BL/6 и резистентной линии DBA/2 выявил зависимость между увеличением локомоторной активности и метаболизмом норадреналина в ретикулярной формации мозга

[Kempf E. et al., 1976]. В свою очередь морфининг синтеза норадреналина при помощи предварительно введенного α -метил-*n*-тирозина, вызывала заметное снижение локомоторной активности как чувствительной к морфину по этому тесту линии C57BL/6, так и резистентной — DBA/2 [Castellano C. et al., 1975a]. Важную роль концентрации ацетилхолина в различных областях мозга для проявления аналгетической реакции на морфин подтвердили эксперименты с септальным поражением мозга мышей, ведущим к снижению холинергической активности в лимбической системе и как следствие этого к редукции обезболивающего эффекта у мышей как чувствительной, так и устойчивой линий. Более того даже исходное состояние холинергических систем у этих линий носит четко выраженный генотипзависимый характер. Показаны различия в активности ферментов, катализирующих синтез и метаболизм ацетилхолина у мышей линий DBA/2 и C57BL/6. Последнюю отличает повышенная активность холинацетилтрансферазы и ацетилхолинэстеразы в определенных участках коры головного мозга [Ebel A. et al., 1973]. Детальное исследование регионального кругооборота ацетилхолина у стандартных инбредных линий мышей (табл. 5) показало пониженную способность к превращению данного нейромедиатора в лимбической системе мышей, чувствительных к обезболивающему действию морфина [Oliverio A. et al., 1978].

Таблица 5

Генотипзависимые эффекты морфина на метаболизм ацетилхолина

Линия	Полосатое тело		Лимбическая область	
	контроль	морфин	контроль	морфин
C57BL/6	$0,75 \pm 0,033$	$0,40 \pm 0,024 *$	$0,36 \pm 0,019$	$0,29 \pm 0,030$
DBA/2	$1,0 \pm 0,050$	$1,2 \pm 0,048$	$0,40 \pm 0,029$	$0,28 \pm 0,018$

* Различия статистически достоверны.

В то же время снижение оборота ацетилхолина в полосатом теле мозга мышей линии C57BL/6 отражает, по-видимому, увеличение скорости превращения дофамина после введения наркотика. Вовлечение дофаминергической системы в реализацию морфининдуцированной локомоции у мышей, таким образом, не вызывает

сомнения. Исследование выделения дофамина, определяемого по содержанию 3-метокситирамина, а также уровня цАМФ и цГМФ в полосатом теле и мозжечке у диссоциирующих по чувствительности к опиатам линий мышей показало, что животные с выраженной локомоторной и слабой аналгетической реакцией на морфин имеют уровень дофамина и цАМФ значительно выше в полосатом теле мозга уже через 10 мин после инъекции наркотика. В то же время содержание цАМФ в мозжечке, не имеющем дофаминергических терминалей, не изменялось. Морфин также не влиял на содержание 3-метокситирамина в полосатом теле мозга мышей, высокочувствительных только к обезболивающему эффекту наркотика (линия DBA/2). Одновременно выявилось разнонаправленное действие морфина на уровень цГМФ мозжечка: повышение содержания его у мышей линии C57BL/6 и выраженное снижение у мышей линии DBA/2. Галоперидол (антагонист дофамина) и налтрексон (антагонист морфина) препятствовали изменению содержания как нейромедиатора, так и циклических нуклеотидов. Эти данные свидетельствуют о глубокой заинтересованности дофаминергической системы в обеспечении двигательной активности, включая и межлинейные различия в выраженности этого вида поведения после введения опиатов [Racagni G. et al., 1979].

Известно, что биохимические корреляты поведенческих реакций, полученные на стандартных и селективно выведенных линиях, часто не совпадают. Так, и в данном случае не явилась исключением и попытка В. А. Judson и А. Goldstein (1978) выявить нейромедиаторы, ответственные за сохранение признака «бегания» у селективно выведенных «бегающих» и «небегающих» линий. Данные линии животных были получены скрещиванием самцов и самок мышей Swiss-Webster, отобранных по высокой или низкой локомоторной реакции на введение 20 мг/кг леворфанола. После четырех генераций признак «небегания» сегрегировал у F₁-гибридов, в то время как противоположный признак дивергировал более слабо. «Небегающая» линия характеризовалась наряду со сниженной способностью к морфин-индуцированной локомоции более сильной аналгетической реакцией, чем мыши F₀-штаoka. Однако авторам не удалось выявить никаких различий в содержании

дофамина и серотонина в мозге чувствительных и резистентных линий, в то время как высокий уровень норадреналина обнаружен у «небегающей» линии мышей.

К сожалению, в данном случае невозможно сопоставить результаты по нейромедиаторным коррелятам поведенческих реакций на морфин стандартных инбредных и селективно выведенных линий, так как в последнем случае определение катехоламинов проводилось в целом гомогенате. Это могло не отражать истинного баланса дофамина в узкоспециализированных областях (полосатое тело). Тем не менее данные литературы убеждают нас в существовании титимной взаимосвязи между нейромедиаторами, опосредующими фармакологические эффекты морфина, а с другой стороны — свидетельствуют о различных биохимических механизмах, определяющих двигательное и болевое поведение, индуцируемое морфином у мышей.

В последнее время была сделана попытка установить, в какой мере чувствительность мышей к однократно введенному наркотику соответствует скорости развития основных стадий экспериментальной наркомании на фоне хронического введения морфина. Эксперименты, проведенные на пяти линиях крыс [Satinder S., 1976], показали, что чувствительность к морфину, определяемая по тесту избегания, совпадает с выраженностью симптомов абстиненции, возникающей при отмене морфина. У крыс линии RLA/Lu, максимально восприимчивых к наркотику (по поведенческому тесту), в отличие от животных устойчивой линии (MNR/Har/Lu) резко выражены диарея, реактивность и сексуальная стимуляция, которые использованы в данной работе как критерии физической зависимости. В то же время не было различий в токсичности морфина для крыс всех исследуемых линий, что свидетельствует о раздельном генетическом контроле этих признаков. У мышей различных линий двигательная активность после введения морфина повышалась в следующем порядке: DBA/2, A/J, ICR, Swiss, C3H и C57BL/6, а по скорости наступления налоксонпреципитированной абстиненции те же линии образовывали следующий ряд: C57BL/6 > Swiss > C3H > ICR > A/J > DBA/2. Сопоставление полученных рядов позволяет заключить, что локомоторная реакция и стереотипические прыжки (jumping) — наиболее яркий признак абстиненции у мышей — происходят

при участии одних и тех же нейрональных путей [Brasse D. A., Samath-Khana S., 1976]. Межлинейные различия, определяемые по локомоторному тесту, совпадают по критерию предпочтения, который позволяет максимально приблизить экспериментальную модель наркомании у грызунов к аналогичному патологическому состоянию у человека [Stolerman J. R., Kumar R., 1970]. При исследовании мышей линий C57BL/6, CBA и DBA/2 выявлены существенные различия в добровольном потреблении морфина, что и позволило выделить C57BL/6 как линию с генетически предопределенным предпочтением к этому виду наркотика [Eriksson K., Kiianmaa K., 1971]. Весьма вероятно, что одна и та же генетическая детерминанта и единый нейро-биохимический механизм определяют выраженность локомоции при введении морфина, предпочтение к определенным наркотикам и скорость развития абстиненции на фоне искусственно выработанной физической зависимости от опиатов. Следует обратить внимание на то, что в последних двух случаях речь идет о генетическом контроле развития поздних стадий наркомании, являющихся завершением длительной дискоординации биохимических и нейрофизиологических процессов при введении морфина.

Что же считать отражением первичного, или непосредственного, механизма, ответственного за эмоциональное влечение к наркотику? Поиск нейроанатомических коррелятов при помощи выключения отдельных структур мозга показал, что на индуцируемую морфином локомоцию не влияет разрушение лимбической системы мозга, однако подобная операция предотвращает опиатную анальгезию. Предполагают, что лимбическая область мозга, ответственна за эмоциональные проявления болевой реакции, является определяющей и в развитии эйфории при введении морфина. Служит ли высокая болевая реакция на морфин проявлением конституциональной восприимчивости к наркотикам? Косвенно высокую наркотическую специфичность анальгетической реакции подтверждает энкефалинрецепторная теория S. H. Snyder (1977). Таким образом, чувствительность экспериментальных животных, определяемая по анальгетической и локомоторной активности, контролируется различными генами, опосредуется различными биохимическими механизмами и имеет отдель-

ные анатомически очерченные сферы реализации. Кроме того, высокая аналгетическая чувствительность выражает неустойчивость организма к наркотизации, адекватную психическому влечению у людей. Вторым типом чувствительности, выявляемый по тесту локомоторной активности, причинно связан со скоростью развития последующих, вторичных стадий заболевания, адекватно отраженных в эксперименте как физическая зависимость и абстинентный синдром.

Барбитураты. Первые успехи в области фармакологической генетики барбитуратов были сделаны в 50-е годы, когда исследователи обратили внимание на различную реакцию некоторых линий мышей на барбитураты, широко используемые в экспериментальной работе для наркотизации. Основным фармакологическим тестом, при помощи которого в то время типировали выраженность ответа на введение снотворных препаратов, был рефлекс правильного положения тела. Утрата и восстановление его в достаточной мере объективно отражают начало и окончание периода наркотического сна. В табл. 6 приведены данные о вариации гипнотической реакции при введении 125 мг/кг гексобарбитала инбредным (1—10 линии) и неинбредным (11

Таблица 6

Чувствительность мышей различных линий к гексобарбиталу

Линия	Число мышей	Время сна, мин	Линия	Число мышей	Время сна, мин
AL/H	25	48,44	C57BL/dMN	15	31,93
DBA/2JN	64	46,83	C3HfB/HeN	30	22,02
A/HeN	27	41,25	BRSUNT/N	38	18,08
BALB/cAnN	63	41,25	SWR/HeN	38	18,08
C57BL/HeN	29	32,52	CFW	32	46,43
C57BL/6JH	37	32,56	SWISS	43	44,39

и 12) линиям мышей [Jay R., 1955]. Выраженные различия в гипнотической реакции на другое производное барбитуровой кислоты — этаминал — описаны на примере линий C57BL и C3H, причем последняя выделена как наиболее устойчивая [McLaren A., Michia D., 1956].

Однако для сравнения результатов, полученных при использовании разных препаратов на генетически го-

могенных животных, оказалось необходимым учитывать особенности метаболической трансформации этих веществ в организме. Как известно, производные барбитуровой кислоты — типичные представители класса индукторов системы микросомальных ферментов печени, осуществляющих метаболизм чужеродных соединений. Активность микросомальных гидроксилаз в печени индивидуальна для отдельных линий мышей. Различие же в индукции ферментов под действием барбитуратов носит не только количественный, но и качественный характер, так как у генетически неоднородных мышей индуцируются различные формы цитохрома Р-450 — терминальной оксидазы, которая катализирует окисление ксенобиотиков. Линейные различия в содержании цитохрома Р-450 и соответственно в скорости метаболизма барбитурата могут существенно исказить данные о собственной восприимчивости животных к этим препаратам. Изучение скорости метаболизма снотворных, содержания их в крови и мозге при пробуждении позволило уточнить характер генетического контроля чувствительности к барбитуратам. Оказалось, что одним из наиболее важных биохимических параметров можно считать концентрацию барбитурата в ткани мозга при пробуждении. Данный показатель четко коррелирует с длительностью наркотического сна экспериментальных животных. Нелинейные мыши с одинаковой гипнотической реакцией на снотворное имеют идентичную концентрацию препарата в мозге [Jori A. et al., 1970]. Зависимость времени сна от концентрации снотворного в ткани мозга, определяемая в конечном счете скоростью метаболизма барбитуратов, показана в ряде других работ.

Анализ чувствительности мышей линий C57BL, BALB/c и 129J к барбитуратам, проведенный под контролем активности микросомальных ферментов, позволил установить, что у мышей линии C57BL метаболизм препарата в микросомах выше, а длительность сна ниже, чем у мышей других исследованных линий. У мышей линии BALB/c и 129J соотношения исследуемых параметров были обратными [Catz C., Yaffe S. H., 1967]. Особо выделяют группу внутрилинейных факторов, способных модифицировать реакцию животного на снотворное: возраст, пол, питание и концентрацию половых гормонов в крови [Westfall B. et al., 1964]. По-ви-

димому, влиянием факторов окружающей среды и различием в условиях эксперимента можно объяснить несоответствие данных, получаемых на животных одинаковых линий в разных лабораториях.

Так, E. S. Vessel (1968) относит линию C57BL/6 наряду с A/LN и DBA/2N к чувствительным, а линии BALB/c и C3H/HeN — к резистентным по отношению к барбитуратам. Автор не выявил связи между временем сна и содержанием гексобарбитала в мозге. По его мнению, активность гексобарбиталгидроксилазы в большой мере отражает одну из причин межлинейных вариаций фармакологических эффектов барбитуратов. Однако постулировать, что в основе линейных различий чувствительности к барбитуратам лежит скорость их деградации, оказалось невозможным. Существуют некоторые экспериментальные данные, не укладывающиеся в «метаболическую» схему.

Оказалось, что скорость развития толерантности к снотворному эффекту не коррелирует со способностью барбитуратов к индукции микросомальных ферментов печени [Сергеев П. В., Ведерникова Н. Н., Майский А. И., 1976], а концентрация барбитуратов в мозге при моделировании толерантности по тесту двигательной активности даже возрастает [Caldmell J. et al., 1978]. Более того введение животным нейротропных препаратов центрального действия, например амфетамина, вызывало изменение времени пентабарбиталового сна без воздействия при этом на скорость метаболизма барбитурата и на концентрацию его в ткани мозга [Jori A. et al., 1970]. Данный феномен, по-видимому, по своему генезу сходен с длительной латентной гиперчувствительностью животных к барбитуратам, при которой влияние его на метаболические процессы полностью исключалось [Aston R., 1966]. Эти факты свидетельствуют о значении чувствительности ЦНС в фармакологическом ответе организма на введение барбитуратов. В опытах на крысах также не было обнаружено связи между длительностью сна, содержанием гексобарбитала и этаминала и активностью метаболизирующих ферментов печени.

Исследуя чувствительность различных линий мышей к гексобарбиталу, S. Halevy и соавт. (1974) использовали две инбредные линии (BSVS и BRVR), резко различающиеся по основным биохимическим, иммунологиче-

ческим параметрам и фармакологической реакции на барбитураты. Эти линии были названы барбитуратчувствительной (BRVS) и барбитуратрезистентной (BRVR). Региональное распределение [^3H]-гексобарбитала в мозге и концентрации препарата при пробуждении, а также измерение скорости его метаболизма в микросомах печени не выявили строгой закономерности между этими показателями и типом поведенческой реакции на барбитураты. Это позволило авторам сделать заключение о генетически контролируемых различиях в чувствительности ЦНС к этим соединениям.

Пока трудно определить, в какой мере наследственно предопределенная неустойчивость к барбитуратам, изучаемая по гипнотической реакции, может отражать развивающееся в патологических случаях влечение к повторному их приему.

Что касается общности патогенетических механизмов барбитуратомании и опиомании, то имеющиеся в настоящее время данные не позволяют полностью исключить или, напротив, постулировать единые пути развития психического и физического влечения к этим веществам. При помощи иммунофлюоресцентного метода получены доказательства, свидетельствующие о максимальном накоплении барбитуратов в лимбическом отделе мозга [Pertschuk J. et al., 1976]. В этой связи следует напомнить, что лимбическая система играет существенную роль в реализации наркотических эффекторов морфина. В этом отделе головного мозга концентрация опиатных рецепторов наиболее высокая, и, хотя прямая конкуренция барбитуратов за специфические рецепторы морфина *in vitro* не показана [Pert C., Snyder S. H., 1973], мы не можем исключить возможность опосредованного физиологически сопряженного взаимодействия этих двух классов наркотических веществ в ЦНС, включающего единые эффекторные механизмы. Косвенным подтверждением данного положения служит тот факт, что специфический антагонист морфина — налоксон, блокирующий опиатные рецепторы, обладает способностью задерживать наступление и снижать длительность сна, вызванного внутрибрюшинным введением 35 мг/кг массы тела пентобарбитала. Кроме того, налоксон снижает токсические эффекты барбитуратов [Fürst Z. et al., 1977], повышая LD_{50} от 59 до 101,1 мг/кг, что позволяет применять его в клинической

практике в качестве эффективного средства при интубации и интубации барбитуратов. Идентификация общих фармакологических механизмов позволит в дальнейшем установить биологические процессы, ответственные за развитие толерантности к барбитуратам.

Проблема наследования типа чувствительности к барбитуратам исследована недостаточно, и пока трудно сделать однозначные выводы. Сравнение реакции мышцей F_1 -гибридов и родительских линий — C57BL (устойчивая) и C3H (чувствительная) — позволило выяснить наследование устойчивости по отношению к снотворному эффекту барбитуратов. E. S. Vessel (1968), используя для генетического анализа чувствительности к гексобарбиталу F_1 -гибриды от скрещивания самок BALB/c (устойчивая линия) и самцов AL/N и DBA/2N (обе высокочувствительные линии), определял наследственный тип реакции по времени сна и активности гексобарбиталгидроксилазы в печени. Реакция F_1 -гибридов имела промежуточные значения между ответом их устойчивых и резистентных родителей. У поколения от возвратного скрещивания мышцей AL/N и DBA/2N обнаружены более длительное время сна и низкая активность гексобарбиталгидроксилазы по сравнению с родительскими линиями, что можно рассматривать как доказательство частичной доминантности с возможным аддитивным взаимодействием генов.

Известно, что чувствительность к снотворному и токсическому действию барбитуратов диссоциирует. Тем не менее определенный интерес представляет характер наследования реакции на токсические дозы барбитуратов. Диаллельное скрещивание мышцей BALB/c (низкая смертность) и C57BL (высокая смертность) выявило доминантное наследование низкой токсичности, не сцепленное с полом. Возможно, что наследование типа чувствительности к снотворным дозам барбитуратов в отличие от признака выживаемости при введении токсических доз препарата имеет характер частичной доминантности у одних линий и рецессивности у других. Совершенствование методов регистрации гипнотической реакции у экспериментальных животных и стандартизация условий тестирования в разных лабораториях позволит в дальнейшем уточнить закономерности наследования различных эффектов барбитуратов.

Этанол. Центральные эффекты этанола неравнозначны. В экспериментах на мышах установлено, что низкие дозы (0,5—1 г/кг массы тела) стимулируют двигательную активность животных, высокая доза (4 г/кг) понижает, а промежуточная (2 г/кг) вызывает двухфазный эффект: депрессию после стимуляции. В этой связи генотипзависимые различия в реакции животных на однократное введение алкоголя определяются по поведенческим тестам — локомоторной активности и депрессии, которая регистрируется по снижению локомоторной активности и (при повышении дозы) по гипнотической реакции.

Однократное введение этанола в дозах от 0,5 до 2 г/кг массы тела мышам линий C57BL/6 и BALB/c, F₁-гибридам, а также рекомбинантно-инбредным линиям CXBJ, CXBI, CXBK, CXBG, CXBN и CXBE вызывает прогрессивное снижение локомоторной активности. Наиболее чувствительным к действию этанола оказались животные линий C57BL/6, CXBE и CXBD; относительная устойчивость к депрессивному эффекту алкоголя обнаружена у мышей линии CXBJ, CXBI, BALB/c и ряда других; F₁-гибриды имели промежуточную реакцию [Oliverio A., Castellano C., 1974a]. Использование конгенных (отличающихся только по H-генам) линий позволило авторам выделить ген, ответственный за выраженность двигательной реакции у мышей при введении этанола. По мнению этих исследователей, фактор, модифицирующий действие этанола, связан с H-геном (WL3K), локализованным в 4-й хромосоме (8-я группа сцепления), и различные аллели этого гена определяют высокую (C57BL/6-подобную) или низкую (BALB/c-подобную) реакцию мышей на алкоголь (рис. 23).

Для генетического анализа чувствительности грызунов к алкоголю проводится селективный инбридинг беспородных и рандомбредных животных с выделением резистентных и чувствительных к этанолу линий крыс и мышей. Изучение реакций селективно выведенной линии крыс с высокой чувствительностью к этанолу в стандартных фармакологических тестах на двигательную активность, оцениваемую в актометре, «открытом поле» и вращающемся колесе, показало выраженное снижение локомоции у данных животных в среднем на 90% после внутрибрюшинного введения 1,5 г/кг этанола [Worsham E. D. et al., 1977]. В то же время число

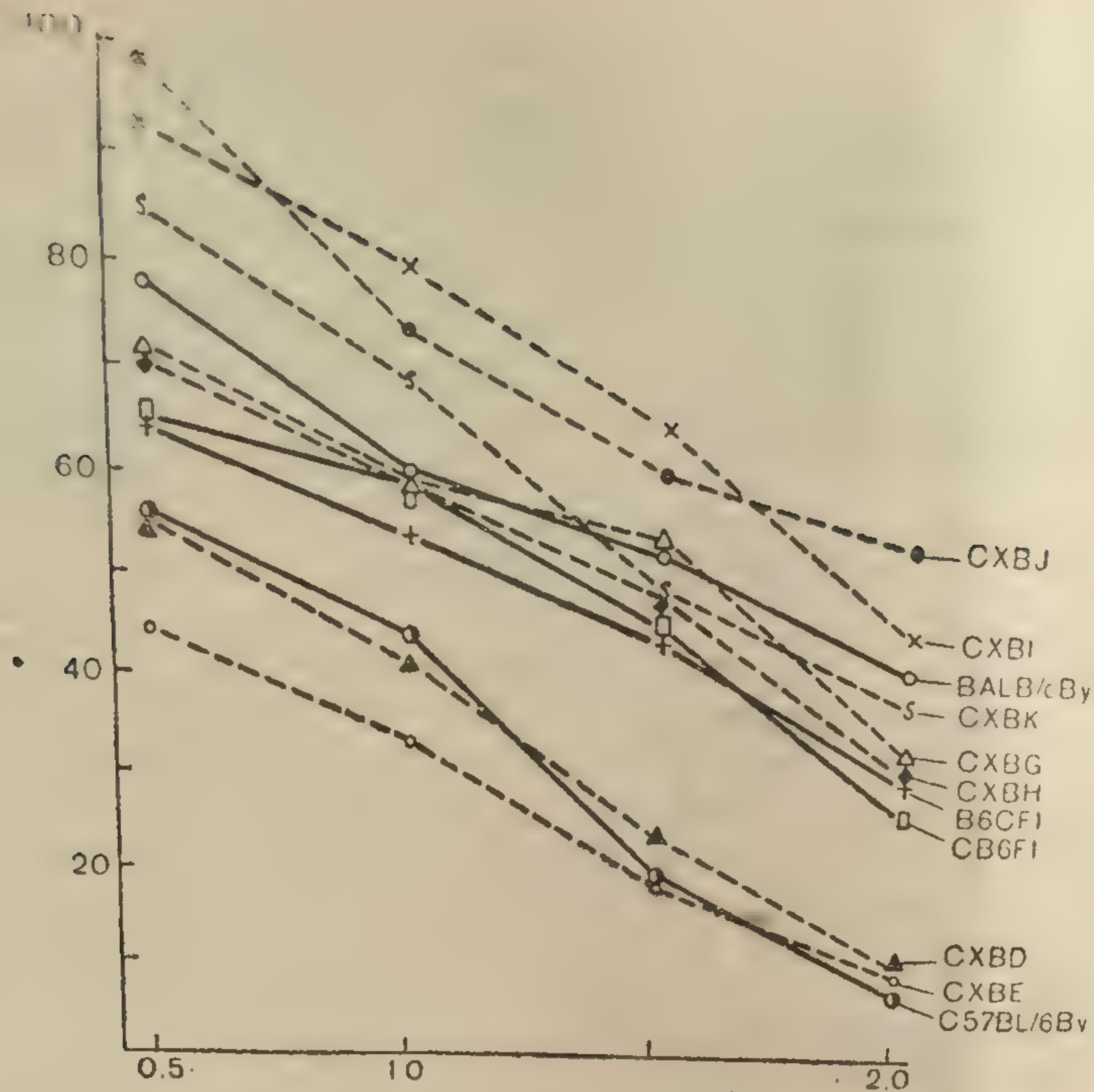


Рис. 23. Двигательная активность стандартных и рекомбинантно-инбредных линий мышей при однократном введении этанола.

На оси абсцисс — доза этанола (г/кг); на оси ординат — процент от контрольного уровня.

спонтанных движений у крыс нечувствительной к этанолу линии снижалось только на 40%. Особенности в восприимчивости к алкоголю не только сохранялись, но и даже усиливались в последующих поколениях крыс [Riley E. P., Lochry E. A., 1977]. Как оказалось, различие в действии этанола на двигательную реакцию чувствительных и резистентных линий крыс не связано с исходным уровнем локомоции и свидетельствует о высокой ценности данного теста при определении генетически закодированной восприимчивости грызунов к алкоголю.

При хроническом введении этанола широко используются тесты предпочтения (животному предлагают на выбор воду и 5—15% раствор алкоголя) и потребления (животному дают только 5—15% раствор алкоголя) и регистрируют количество выпитой жидкости. Линейные различия по тесту предпочтения, определяемые у

стандартных инбредных линий мышей C3H, C57BL/6, DBA/2, ICR и ddY, позволяют выделить высоко и низкочувствительные инбредные популяции, что свидетельствует о генетическом контроле этого признака. Так, мыши линии DBA/2 в наименьшей степени предпочитают этанол, но в период абстиненции у них наблюдают тонико-клонические судороги и даже смертельные исходы на фоне умеренной интоксикации. В то же время наиболее высокая степень предпочтения этанола и незначительная выраженность симптомов абстиненции характеризуют мышей линии C57BL/6. В среднем при анализе данных линий мышей не удастся обнаружить положительную корреляцию между потреблением, предпочтением и тяжестью абстинентного синдрома [Komiya T. et al., 1978].

В то же время диссоциация животных по тесту предпочтения наблюдается и внутри самих линий. В качестве примера приведем данные A. Jous и P. Lipra (1978), согласно которым внутри групп крыс стандартных инбредных линий Wistar и Sprague-Dawley можно выделить животных с высоким и низким потреблением алкоголя. Так, у 28—30% крыс Wistar в условиях свободного выбора зарегистрировано прекращение потребления этанола при постепенном повышении его дозы с 1 до 19%, тогда как для 50—55% крыс максимально переносимой является 70% концентрация. Аналогично 25% крыс линии Sprague-Dawley переносят 20—29% концентрацию этанола, в то время как для 50% животных предельно переносимая концентрация достигает 60%. Существование популяции внутри линий с различной чувствительностью к этанолу свидетельствует о значительной роли, помимо генетического контроля, факторов окружающей среды, в том числе и материнского эффекта.

Межлинейные различия по времени сна при введении анестезирующих доз этанола были показаны как при использовании стандартных линий мышей, так и на специально выведенных линиях, различающихся по чувствительности к этанолу [Kakihana R. et al., 1966]. Минимальная наркотическая доза, которая вызывает сон, служит характерным показателем чувствительности мышей к этанолу. Исследованные по этому признаку три стандартные линии расположились в следующий ряд: BALB/c, C57BL/6, DBA/2 [Damjanovich R. P.,

McInnes J. W., 1973]. Попытки найти связь между различиями в чувствительности к однократному введению этанола и скоростью его метаболизма у определенных линий мышей привели к противоречивым результатам. Некоторые авторы [McClearn G. E., 1976] причинно связывают между собой активность ферментов, метаболизирующих этанол (алкогольдегидрогеназа и альдегиддегидрогеназа), с продолжительностью сна и с развитием зависимости от алкоголя. Тем не менее определение активности алкоголь- и альдегиддегидрогеназы у «короткоспящей» и «долгоспящей» линий мышей (выведенных длительным инбридингом из октагибридов A, AKR, BALB/c, C3H, C57B/6, DBA/2) не выявило статистически достоверных различий в активности этих ферментов. Также не отличалась у мышей этих линий скорость исчезновения этанола из венозной крови ретро-орбитального синуса. На основании подобных наблюдений сделан вывод о ведущей роли ЦНС в определении чувствительности к этанолу [Heston W. D., Ervin V. C., 1974]. Аналогичные разногласия, выявляющиеся при работе на стандартных инбредных и на селективных линиях, могут возникать из-за различного сочетания генетических детерминант, контролирующих центральный и периферический механизм чувствительности к этанолу. По-видимому, решающее значение должны иметь данные, полученные на животных специально выведенных линий, так как они происходят от особей с максимальной или минимальной чувствительностью к этанолу, в популяции, и случайные корреляции в этом случае менее вероятны.

Изучая чувствительность двух инбредных линий мышей C57BL/Crgl и A/Crgl по тесту предпочтения к 10% алкоголю, G. E. McClearn и D. A. Rodgers (1961) установили выраженные различия в ответе у животных разных линий. Получение F₁ и F₂-гибридов при скрещивании животных, отличающихся по чувствительности, и выведение обратных кроссов помогли представить доказательства того, что предпочтение к алкоголю определяется существованием полигенной системы с высокой степенью наследования [Rodgers D. A., McClearn G. E., 1962]. Эти данные были подтверждены J. L. Fuller (1964), который изучал предпочтение к этанолу у четырех инбредных линий мышей C3HNEB/FeJ, C57BL/6, A/J, DPH/2J и их F₁-гибридов, полученных

неполными
щих» мы
голю по
отсутстви
линейны
пательно
пользова
ды Wista
бридинг
ле» и по
и по усто
не только
предостав
лению ал
Тестирова
сматриват
эти два пр
«потреблен
доминантн

Повторн
G. E. McC
ster при по
казал, что
оказывать
у последую
к алкоголю
и на трехат
диола и 1-п

Сравнени
и алкогольз
буждения и
ности: депре
анестетическ
комоторная
дозы; обрат
BALB/c. Тр
наличие либо
ющему дейст
прессивной г
dall C. L. et
нии C57BL/6
батывалось о
лировалось пр
нола внутриб

неполным диаллельным скрещиванием. У самок «пьющих» мышей обнаружено меньшее пристрастие к алкоголю по сравнению с самцами. Было постулировано отсутствие материнского влияния на возникновение линейных различий как в пренатальном, так и в постнатальном периоде. Позднее Н. Brewster (1969) использовал в работе линию Maudsey белых крыс породы Wistar, среди которых был проведен селективный бридинг по эмоциональной активности в «открытом поле» и получены линии MR и MNR. Они отличались и по устойчивости к алкоголю. Так, крысы линии MNR не только отдавали предпочтение алкоголю в условиях предоставленного выбора, но и по абсолютному потреблению алкоголя резко превосходили крыс линии MR. Тестирование реакции F₁ и F₂-гибридов позволило рассматривать генетические механизмы, контролирующие эти два признака как отдельные, причем наследование «потребления» в отличие от «предпочтения» является доминантным.

Повторный анализ экспериментальных данных G. E. McClearn, D. A. Rodgers, проведенный Н. Brewster при помощи методов биометрической генетики, показал, что материнский эффект может проявляться и оказывать некоторое влияние на выраженность ответа у последующих поколений. Значительное предпочтение к алкоголю у мышей линии C57BL/6 распространяется и на трехатомные спирты: на 10% раствор 1,2-пропандиола и 1-пропанола [Strange J., Schneider I., 1975].

Сравнение мышей алкогольрезистентной (BALB/c) и алкогользависимой (C57BL) линий по реакциям возбуждения и депрессии выявило следующие закономерности: депрессивный эффект этанола при введении субанестетических доз мышам C57BL был меньше, а локомоторная активность понижалась с повышением дозы; обратные закономерности наблюдали у мышей BALB/c. Трактовка данных позволяет предположить наличие либо гиперчувствительности ЦНС к возбуждающему действию этанола у мышей BALB/c, либо депрессивной гиперреакции мышей линии C57BL/6 [Randal C. L. et al., 1975]. Интересно, что у «пьющей» линии C57BL/6 в отличие от «непьющей» DBA не вырабатывалось отвращения к алкоголю. Последнее моделировалось при сочетанном введении больших доз этанола внутрибрюшинно и раствора сахара per os. В по-

следующем при предоставлении выбора между водой и раствором сахара мыши линии C57BL пьют раствор сахара, а мыши «непьющей» линии избегают этот раствор, что моделирует симптом отвращения [Hogowitz G. P., Whitney G., 1975].

Центральные антагонисты катехоламинов могут модулировать как стимулирующие, так и депрессивные эффекты этанола. При этом блокада β -адренергических рецепторов препятствует проявлению возбуждающего действия, а блокада α -адренергических рецепторов уменьшает выраженность депрессии. Оба эффекта частично снимают антагонисты дофаминовых рецепторов [Matchett J. A., Erickson P. K., 1977]. Активирующее действие этанола на мышей линии ICR может быть существенно ослаблено предварительным введением α -метил-*n*-тирозина. Эти данные объясняют поиск среди нейромедиаторов тех нейрохимических коррелятов, линейные различия в содержании которых могут объяснить вариабельность фармакологических реакций при однократном и хроническом введении этанола мышам с различным генотипом. Сравнение содержания серотонина, норадреналина и дофамина, а также активности холинацетилтрансферазы в мозге не выявило различий у алкогольчувствительных и алкогольрезистентных линий. В то же время низкий уровень холинэстеразы — фермента, метаболизирующего ацетилхолин, в мозге мышей C57BL/6 сочетался с высоким включением (^{14}C)-холина в мембранную фракцию по сравнению с мышами линии DBA/2 [Ho. J. K. et al., 1975]. Это свидетельствует об увеличенном кругообороте ацетилхолина у мышей, чувствительных к алкоголю. Введение ингибиторов холинтрансферазы, приводящее к уменьшению содержания ацетилхолина в мозге, вызывало ослабление предпочтения к алкоголю у мышей C57BL/6, что указывает на важную роль холинергической системы в реализации наследственной предрасположенности к алкоголю.

Выше указывалось на определенные различия нейромедиаторных систем мышей линии C57BL/6, DBA/2, BALB/c и ряда других и обсуждалось возможное их участие в развитии некоторых симптомов длительной морфинизации. Совпадение гиперчувствительности животных с определенным генотипом (C57BL/6) к разным видам наркотиков указывает на сходные генетические

меха
Одна
роме
чески
П
реце
ях м
услов
взаим
реце
польз
тетро
табол
подоб
цепто
цифич
имод
жит в
фина
алкого
Ис
этанол
тивност
солино
ет лог
нии. В
нии в
у данн
солино
ния др
и на 2
комбин
линола
спонта
наруше
выраж
показы
ных по
тетраг
после
чувств
генетич
Гла
ность с

механизмы, участвующие в регуляции этого признака. Однако линейные различия в уровне кругооборота нейромедиаторов не исчерпывают все возможные этиологические факторы.

Полученные в последние годы данные об опиатных рецепторах и эндогенных морфиноподобных соединениях мозга как первичного звена в действии опиатов обусловили проведение экспериментов, доказывающих взаимодействие этанола со специфическими опиатными рецепторами. Наиболее значимым свидетельством в пользу этого предположения следует считать открытие тетрагидроизохинолинов — продуктов конденсации метаболитов этанола и дофамина, обладающих опиатоподобной активностью и аффинитетом к опиатным рецепторам. Предполагают, что блокада налоксоном специфических опиатных рецепторов, исключая взаимодействие последних с тетрагидроизохинолинами, лежит в основе блокирующего эффекта антагониста морфина по отношению к фармакологическому действию алкоголя [Blum K. et al., 1977].

Использование селективных по чувствительности к этанолу линий для тестирования на поведенческую активность одного из вышеуказанных соединений — салсолинола — показало, что подобно этанолу он снижает локомоцию мышей при внутрицистернальном введении. Высокая степень корреляции получена при сравнении выраженности падения двигательной активности у данных линий мышей после введения этанола и салсолинола. Депрессивный эффект последнего (уменьшения двигательной активности на 70% у чувствительных и на 23% у резистентных животных) усугубляется при комбинированном внутрибрюшинном введении салсолинола с этанолом в дозах 1,5 и 2 г/кг. Снижение числа спонтанных движений в этом случае сопровождается нарушением координации, в значительно большей мере выраженным у чувствительных животных. Эти данные показывают, что эффект этанола на поведение животных по крайней мере частично обусловлен действием тетрагидроизохинолинов, образующихся в организме после введения алкоголя [Church A. C. et al., 1977], а чувствительность к обоим соединениям находится под генетическим контролем.

Главная система гистосовместимости и чувствительность организма к наркотикам. Как следует из выше-

изложенного, чувствительность к наркотикам контролируется генетически. Однако вопрос о генетических маркерах, позволяющих определить тип наследственной реакции у человека и животных, до сих пор остается открытым. Некоторые успехи в последние годы достигнуты и в этом направлении: выявлены особенности папиллярных узоров при исследовании дерматоглифики больных алкоголизмом, найдены определенные корреляции между предрасположенностью к алкоголизму и дефектами цветного зрения, а также группами крови и т. д. В то же время уровень корреляции между этими признаками и частотой заболевания крайне невысок, что позволяет усомниться в специфичности этих биологических маркеров.

Для экспериментальных поисков биологических коррелятов повышенной чувствительности организма к различным наркотикам большое значение имеет удачный выбор модели. В нашей лаборатории фармакологический анализ восприимчивости мышей к наркотикам проводится с учетом строения системы H-2 [Maisky A. I., Vedernikova N. N., 1974]. Сейчас хорошо известно, что особенности главной системы гистосовместимости тканей человека (HLA) и мыши (H-2) ассоциируются с предрасположенностью к различным заболеваниям. Наличие определенных антигенов H-2 и HLA в фенотипе мыши или человека свидетельствуют о наследственной неустойчивости к заболеваниям костно-суставной, эндокринной, нервно-психической и других систем, а также повышенной чувствительности к ряду вирусов [Snell G. D. et al., 1976]. Главную систему гистосовместимости млекопитающих отличает крайний полиморфизм. Наиболее хорошо изученная главная система гистосовместимости мыши (H-2) включает в себя несколько локусов, определяющих силу иммунного ответа и ответственных, по-видимому, за связь с иммунными заболеваниями.

Чрезвычайно важным для понимания биологической роли системы H-2 является открытие регуляции этой системой уровня циклических нуклеотидов в печени, селезенке и половых железах, а также реакции последних на экзогенно поступившие гормоны, кодирование высокого или низкого уровня тестостерона и специфического андрогенсвязывающего белка в плазме крови. A. S. Goldman и соавт. (1977) показали, что продукт

системы H-2 является также рецептором кортикостероидов. Главная система гистосовместимости участвует в регуляции не только эндокринной, но и нейромедиаторной системы [Smeraldi E., Scorza-Smeraldi R., 1976]. Выявлено структурное сходство лимфоцитарного антигена человека HLA-A1 и в меньшей степени других специфичностей с дофаминергическими и β -адренергическими рецепторами. Оказалось, что преинкубация аминазина и некоторых его метаболитов с HLA-A1 приводит к утрате чувствительности данного антигена к цитотоксическому действию анти-HLA-A1-антител и комплекса. Среди дериватов аминазина наиболее выраженным протекторным действием обладает 7-ОН-аналог, при клиническом испытании которого выявлена его антипсихотическая, нейролептоподобная активность. Это наблюдение указывает на огромную роль определенных HLA-специфичностей в индивидуальном ответе организма на нейролептики [Smeraldi E. et al., 1980].

Возможно, что диссоциация в чувствительности линий, отличных по системе H-2, к гормонам и нейромедиаторам обусловлена упомянутыми выше колебаниями базального уровня цАМФ, так как показано, что система H-2 модулирует и реакцию циклических нуклеотидов на гормональный стимул. Заметные колебания в действии глюкагона, инсулина и простагландинов на аденилатциклазную активность были обнаружены у мышей с гаплотипом H-2^a и H-2^k, что подтверждает возможность регуляции главной системой гистосовместимости специфического взаимодействия гормонов и других мембраноактивных соединений с клеточной поверхностью [Megulo D., Edidin M., 1975].

Именно сходством определенных трансплантационных антигенов с рецепторами гормонов в нейромедиаторов объясняют A. Svejgaard и L. P. Ryder (1976) связь между главной системой гистосовместимости и неиммунными заболеваниями. Согласно этой гипотезе, мембраностроенные и растворимые трансплантационные антигены имеют структурное сходство с рецепторными соединениями. Аффинитет этих лигандов к истинным рецепторам неизмеримо выше, однако количественное преобладание «антигенных рецепторов», локализованных практически во всех органах и тканях, над истинными рецепторами, находящимися в относительно небольшом

числе в основном в органах-мишенях, может привести к патологическому связыванию гормонов, нейромедиаторов, и тем самым создать условия, проводящие некоторые неиммунные заболевания.

Учитывая важность иммунных, эндокринных и нейромедиаторных факторов в формировании чувствительности к наркотикам различного строения у человека и животных, мы предположили возможное участие системы гистосовместимости в генетическом контроле реакции организма на наркотик [Maisky A., Vedernikova N. N., 1978]. Для экспериментальной проверки этого положения были проведены исследования на конгенно-резистентных (КР) линиях мышей, которые отличаются друг от друга либо по всей системе H-2, либо по некоторым ее генам и локусам, в то время как остальные гены у этих линий идентичны. Поэтому различия, полученные в опытах на КР-линиях, следует связывать с вариациями в строении системы H-2. Для изучения вариабельности анагетической реакции при однократном введении морфина в дозе 20 мг/кг методом «горячей пластинки» были использованы самцы мышей КР-линий, полученных на основе A/Sn, C3H/Sn и C57BL10/Sn (табл. 7).

Таблица 7

Характеристика гаплотипа H-2 у мышей КР-линий

Линия	Гаплотип H-2	Линия	Гаплотип H-2
A/SnY	H-2 ^a	C3H.NB	H-2 ^p
ASw	H-2 ^s	C57BL/10SnY	H-2 ^b
A.Ca	H-2 ^f	R101	H-2 ^g
C3H/SnY	H-2 ^k	R103	H-2 ^g
C3H.ON	H-2 ^c	B10.CNB	H-2 ^p
C3H.YK	H-2 ^{la}	B10.M	H-2 ^f
C3H.SW	H-2 ^b	B10.D2	H-2 ^d

Исследования, проведенные на стандартных инбредных линиях (табл. 8) показали, что линии A/Sn и C3H/Sn по болевому тесту значительно более чувствительны к морфину, чем мыши C57BL/10. Аналогичные эксперименты, поставленные с мышами КР-линий, полученных на основе C57BL/10, не выявили существенных различий в реакции на морфин по тесту болевой чувствительности.

Таблица 8

Влияние морфина на болевую чувствительность мышей конгенно-резистентных линий и их F₁-гибридов

Линия	Число мышей	Болевая чувствительность		
		контроль, с	опыт, с	% к контролю
A/Sn	8	10,9±1,06	42,1±5,32	386
A.CA	10	10,0±0,41	47,4±4,08	474
A.SW	9	9,0±0,45	26,5±2,8	294
C3H/Sn	12	11,6±0,34	35,0±3,45	301
C3H.ON	7	14,1±1,12	57,1±1,43	425
C3H.NB	6	14,7±1,0	54,3±3,12	408
C3H.SW	8	12,8±0,79	32,8±0,24	256
C3H.JK	7	12,6±0,39	46,0±4,91	365
C57BL10/Sn	11	10,5±0,59	13,7±0,86	130
B10.D2	7	9,0±0,54	11,4±0,61	126
B10.M	6	11,6±0,62	13,6±0,55	117
B10.CNB	6	9,8±0,63	12,0±0,54	122
R103	6	8,6±0,5	9,2±0,70	107
R101	7	10,0±0,36	10,5±0,87	101
(A.CA×A.SW)F ₁ -гибриды	7	11,0±1,32	45,1±0,51	410
(C3H.ON×C3H/Sn)F ₁ -гибриды	6	13,6±0,81	54,6±2,9	415
(C3H.NB×C3H/SW)F ₁ -гибриды	8	14,6±0,77	51,4±0,84	351

В то же время среди КР-линий, полученных на основе A/Sn и C3H/Sn, аналгетическая реакция которых после введения морфина увеличивалась в несколько раз, удалось выделить линии, различающиеся по чувствительности к наркотику. Так, время болевой реакции на термический раздражитель у мышей линии A.CA увеличивалось по сравнению с контролем на 474% (высокая реакция), а у мышей A/Sn и A.SW — на 386 и 294% (промежуточная и низкая реакции). Термин «низкая» реакция применяется только для характеристики выраженности ответа на морфин среди КР-линий одной группы, так как абсолютно резистентными к наркотику среди исследованных нами линий были только линии, полученные на основе C57BL/10. Во второй группе высокая реакция на морфин по тесту болевой чувствительности обнаружена у мышей линии C3H.ON и C3H.NB (425 и 408% соответственно), промежуточную и низкую реакции наблюдали у мышей линии C3H.JK

(365%), C3H/Sn (301%) и C3H.SW (256%). Поскольку мыши каждой из этих групп различаются только по комплексу генов H-2 и прилегающим к нему участкам хромосомы, то, очевидно, один из локусов, определяющих чувствительность к морфину, находится в комплексе H-2 или тесно сцеплен с ним.

Для определения наследования чувствительности мышей к морфину были получены гибриды F₁ при скрещивании мышей высоко- и низкореагирующих линий, полученных на основе A/Sn и C3H/Sn. Установлено, что реакция всех гибридов была сходна с сильнореагирующими родительскими линиями. Эти данные свидетельствуют о доминантном наследовании высокой чувствительности к морфину, определяемой по аналгетическому тесту [Майский А. И., и др., 1978]. Позднее нами была проанализирована возможность ассоциации системы H-2 с реакцией организма на хроническое введение морфина. Для этой цели были использованы КР-линии, полученные на основе A/Sn (A/Sn; A.SW) и C3H/Sn (C3H.ON; C3H.SW). Толерантность и физическую зависимость при 4-суточном введении морфина моделировали по методу, предложенному J. K. Saelens и соавт. (1971). О степени толерантности судили по снижению обезболивающего эффекта морфина при повторных введениях. Количественную оценку физической зависимости (абстинентный синдром, вызванный введением налофина в дозе 100 мг/кг) проводили путем подсчета количества стереоспецифических прыжков после однократной инъекции налорфина в той же дозе. Изменение двигательной и ориентировочной реакции (локомоции) на фоне хронического введения морфина исследовали по тесту «открытое поле».

Проведенные исследования показали, что толерантность в меньшей, а физическая зависимость в большей степени находятся под контролем главной системы совместимости тканей (табл 9).

Поскольку не было выявлено корреляции между чувствительностью линий по отношению к этим двум стадиям экспериментальной наркомании, мы предположили наличие полигенного контроля данной патологии. Использование теста «открытое поле» в качестве показателя изменения локомоторной и исследовательской активностей у морфинизированных мышей показало, что наркотики дозозависимо изменяют этот тип поведения

Таблица 9

Линейные различия у мышей в развитии стадий экспериментальной наркомании

Линия мышей	Стадии экспериментальной наркомании					
	Толерантность (время болевой реакции)					Физическая зависимость (число прыж- ков за 10 мин)
	контроль	день эксперимента				
		1-й	2-й	3-й	4-й	
A.SW	13±1,6	13±1,1	60*	60*	25±6,8	38±12,3
A/Sn	14±3,0	14±3,1	60*	60*	33±5,8	9±3,2
C3H.ON	11±0,5	60*	60*	60*	23±2,9	12±2,0
C3H.SW	12±0,8	60*	46±6,5	60*	40±10,0	24±3,5

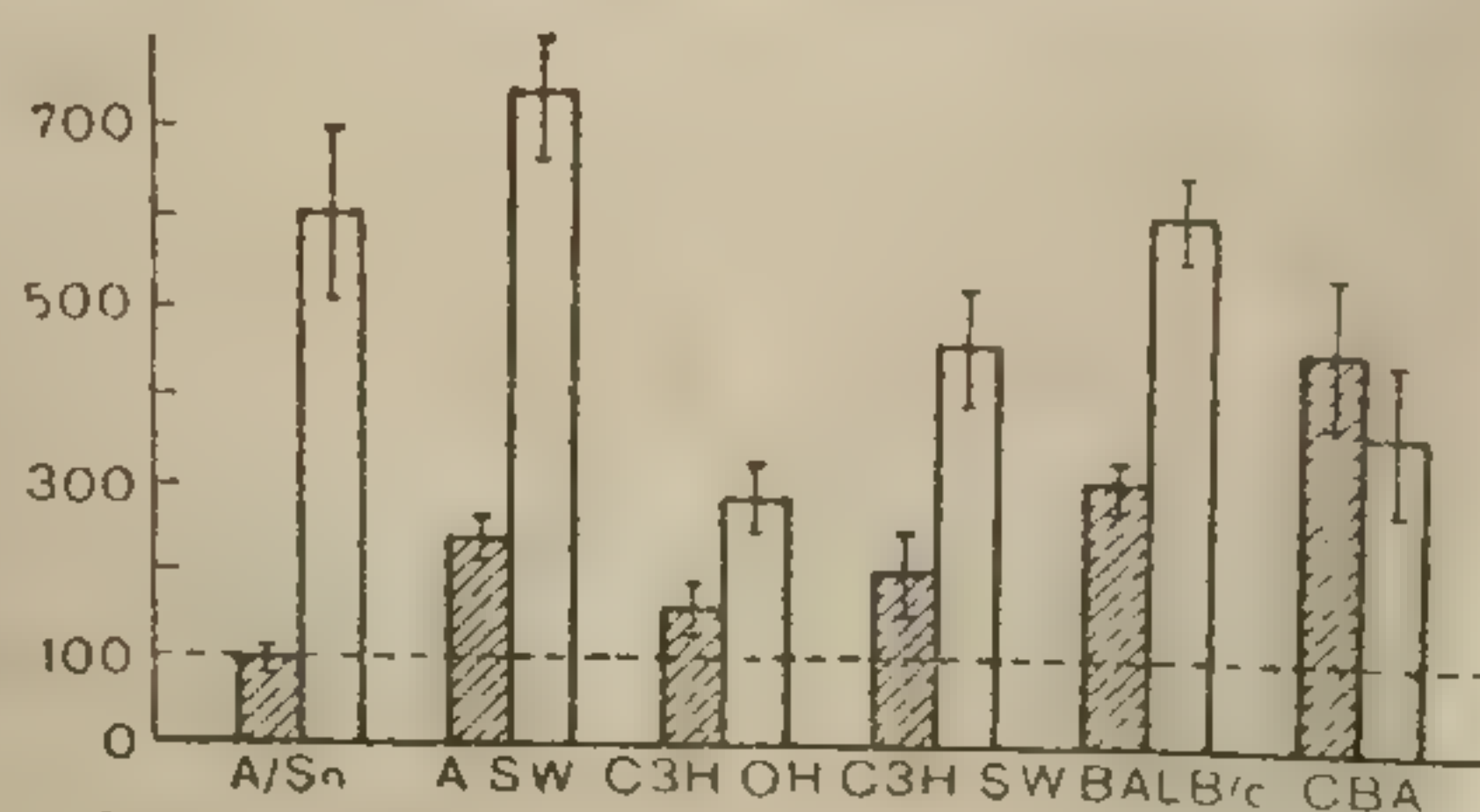
* Статистически достоверное отличие от контроля (максимальный срок наблюдения 60 с).

у всех исследуемых линий (рис. 24). Тем не менее выявляются отчетливые диспропорции в выраженности реакции морфинизированных мышей КР-линий по тесту локомоции. При сопоставлении этих данных и результатов, полученных при моделировании абстинентного синдрома, можно проследить четкую тенденцию к зависимости прыжковой реакции от предшествующего уровня двигательной активности. По-видимому, система Н-2 вовлечена и в контроль такого сложного поведенческого акта, как локомоция, которая в свою очередь имеет те же механизмы реализации, что и прыжковая реакция мышей в условиях спровоцированной налорфином абстиненции [Ведерникова Н. Н. и др., 1978].

Аналогичные подходы были использованы нами совместно с С. В. Шошиной и для выяснения существования связи между главной системой гистосовместимости мыши и чувствительности к алкоголю. Стандартный

Рис. 24. Линейные различия реактивности мышей по тесту «открытое поле» при хроническом введении морфина.

Заштрихованные столбики — суммарная доза морфина 100 мг; незаштрихованные столбики — суммарная доза морфина 500 мг.



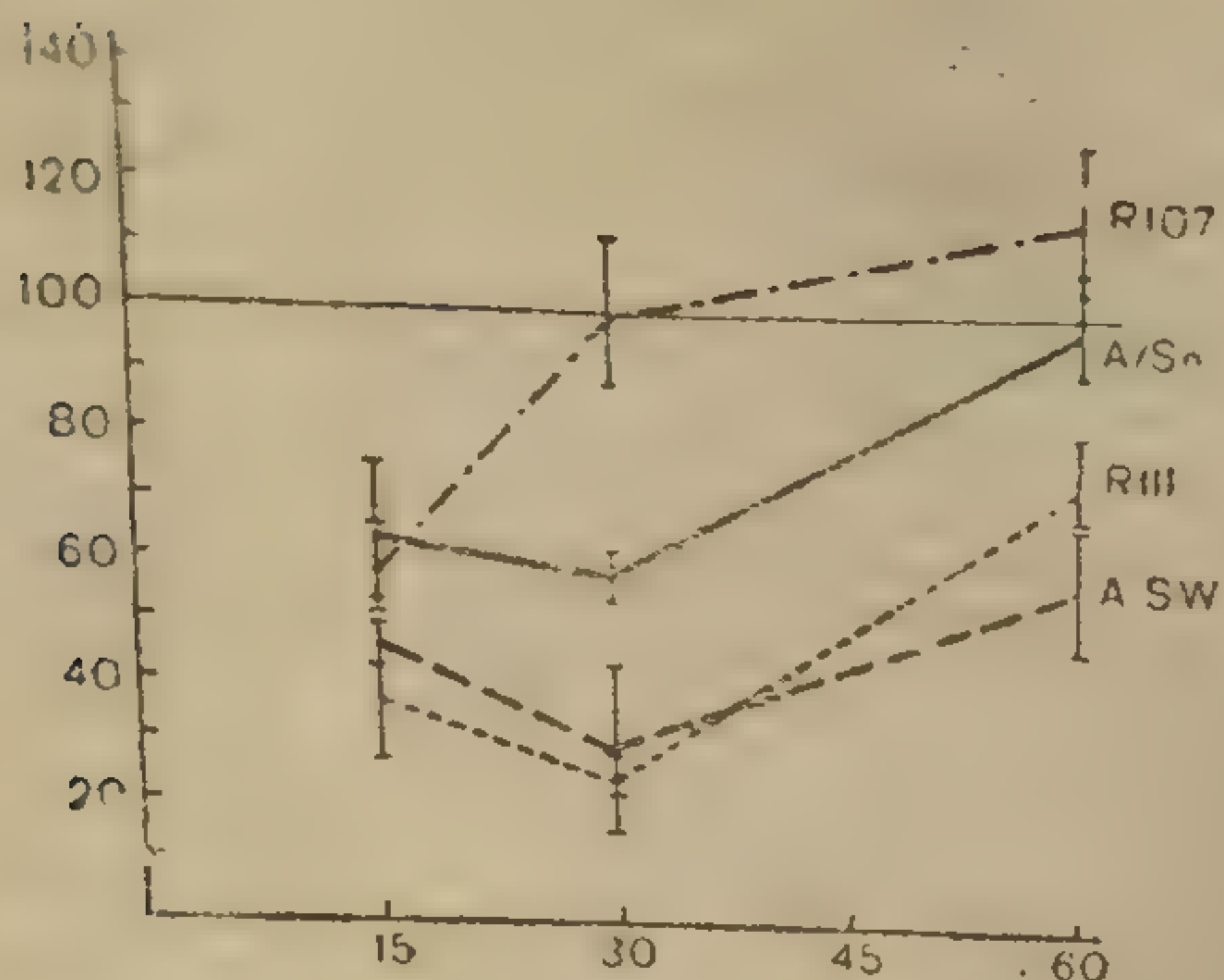


Рис. 25. Динамика локомоторной реакции мышей КР-линий после однократного введения этанола (2,5 г/кг).

На оси абсцисс — время после инъекции этанола, с; на оси ординат — локомоция (процент от контрольного уровня, принятого за 100).

фармакологический тест на двигательную активность (с регистрацией количества движений при помощи фотоэлементов), примененный у КР-линий мышей после однократного введения этанола в дозе 2,5 г/кг, выявил в определенные временные периоды статистически значимые различия в локомоторной реакции животных, отличающихся по системе Н-2 (рис. 25).

Наиболее интересными в свете дальнейших корреляций с клиническим материалом явились данные, отражающие уровень потребления этанола КР-линиями мышей. Для коррекции временных изменений потребности мышей в жидкости в ходе длительного эксперимента в качестве показателя потребления этанола брали отношение выпитого этанола в расчете на 1 кг массы тела в опытной группе (на одну точку от 3 до 5 мышей) к количеству выпитой воды в контрольной группе, содержащейся в аналогичных условиях. Как и в случае с морфином, тип реакции КР-линий соответствовал той стандартной инбредной линии, на основе которой они были выведены. Так, у мышей R107 и RIII (исходная линия C57BL10/Sn) обнаружена большая способность к потреблению этанола, нежели у мышей КР-линии A/Sn и A/SW (стандартная линия A/Sn). Это соответствует более высокому потреблению алкоголя исходной линией C57BL10/Sn по сравнению с A/Sn. Однако среди парных КР-линий можно выделить относительно «много-» (R107 и A/Sn) или «малопьющие» (RIII и A/SW) линии. Несмотря на то что динамика потребления этанола сходна у всех четырех исследуемых линий как в период постоянного доступа к этанолу, так и в период лишения его и постабстинентного синдрома, су-

Рис. 26. Динамика локомоторной реакции мышей КР-линий после однократного введения этанола (2,5 г/кг). На оси абсцисс — время после инъекции этанола, с; на оси ординат — локомоция (процент от контрольного уровня, принятого за 100).

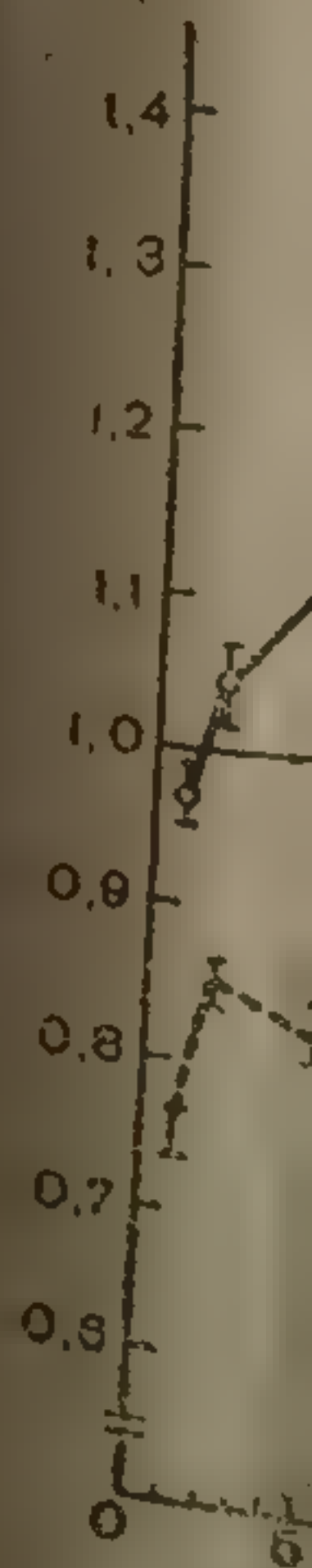


Рис. 27. Динамика локомоторной реакции мышей КР-линий после однократного введения этанола (2,5 г/кг). На оси абсцисс — время после инъекции этанола, с; на оси ординат — локомоция (процент от контрольного уровня, принятого за 100).

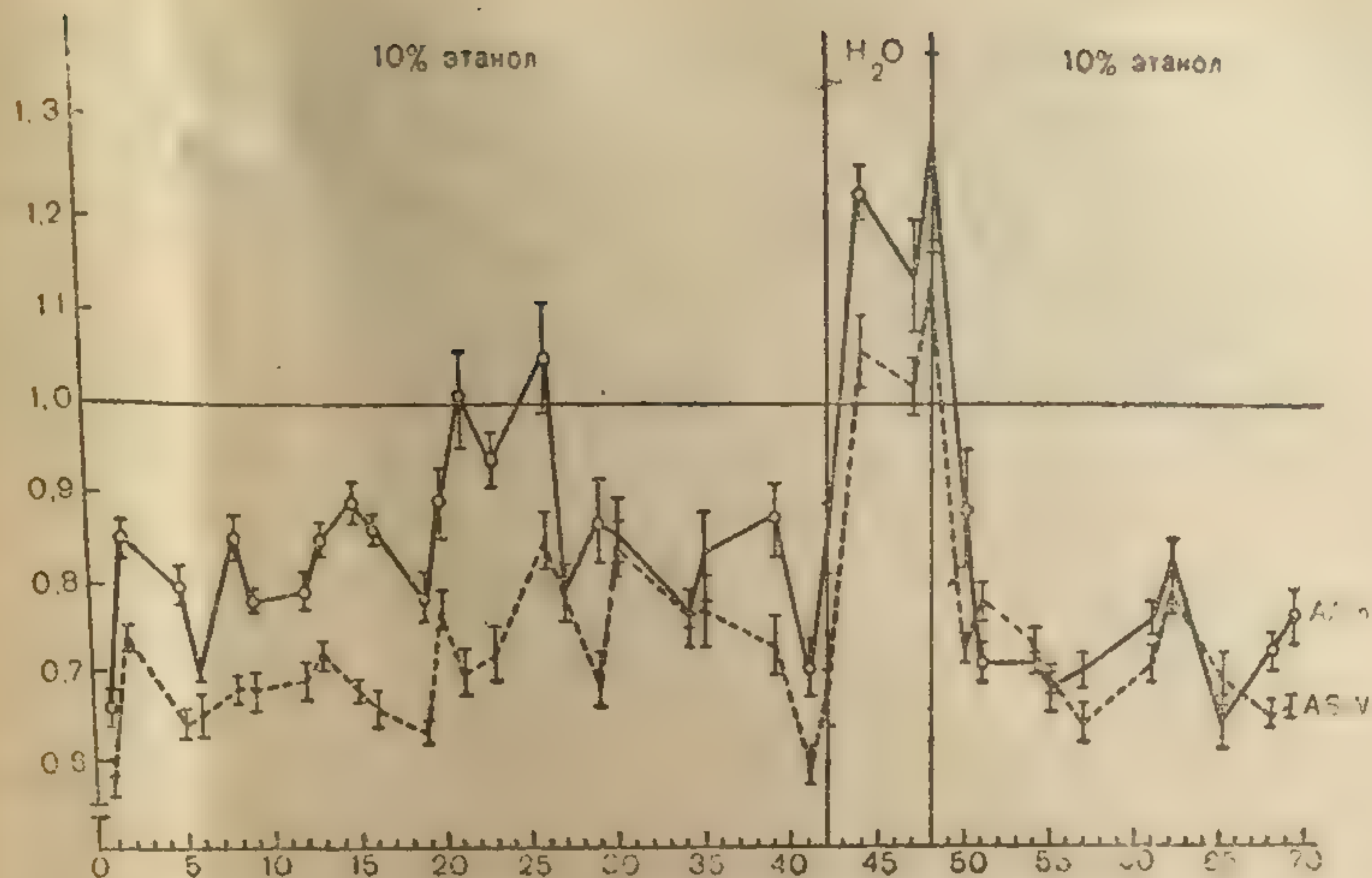


Рис. 26. Потребление этанола мышами КР-линий, выведенных на основе линии A/Sp.

На оси абсцисс — время хронического введения этанола (сутки); на оси ординат — потребление этанола (отношение опыт — контроль).

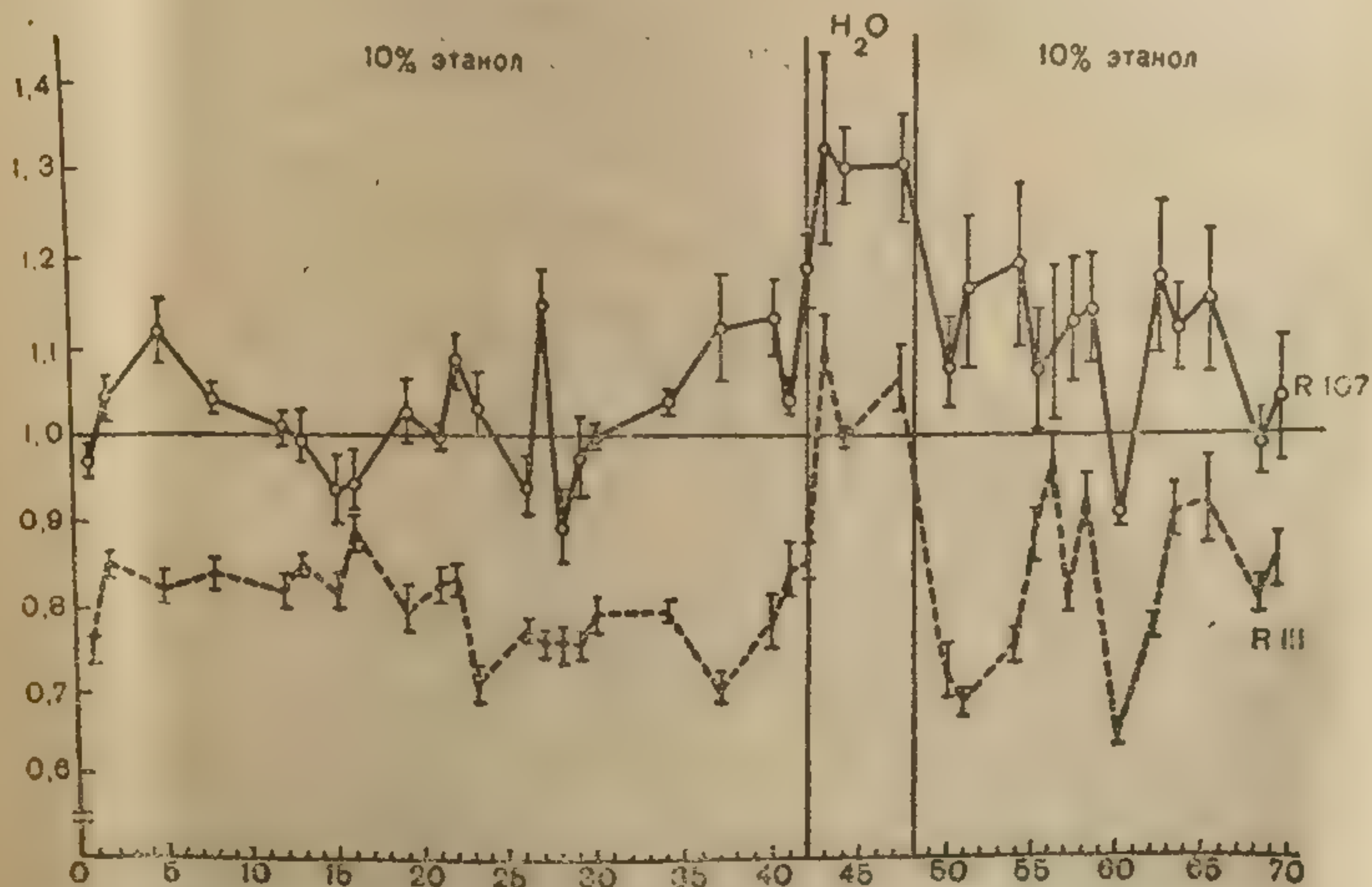


Рис. 27. Потребление этанола мышами КР-линий, выведенных на основе линии C57BL10/Sp.

На оси абсцисс — время хронического введения этанола (сутки); на оси ординат — потребление этанола (отношение опыт — контроль).

существует высокодостоверное отличие в уровне потребления между соответствующими КР-линиями практически на всех стадиях алкоголизации (рис. 26 и 27). Эти данные позволяют утверждать, что система H-2 включена в полигенный контроль врожденного типа чувствительности мышей к этанолу.

Большая ценность экспериментальных исследований с применением в качестве биологического объекта КР-линий мышей обусловлена, во-первых, структуральной общностью и гомологичностью главной системы совместимости ткани мыши и человека, а, во-вторых, возможностью определения гаплотипа HLA при помощи типирования специфическими анти-HLA-сыворотками трансплантационных антигенов человека. Поэтому в случае ассоциации главной системы гистосовместимости с определенной патологией анализ трансплантационных антигенов служит объективным критерием генетической предрасположенности индивидуума к этому заболеванию. Определение маркерных антигенов, характерных для той или иной нозологической формы, позволяет оценить степень риска развития болезни у конкретного человека, а также помогает в постановке диагноза и оценке прогноза заболевания.

Логика фармакологических экспериментов на КР-линиях мышей привела нас к созданию гипотезы, согласно которой система HLA может способствовать при прочих равных условиях развитию наркомании у человека [Майский А. И., и др., 1978a]. Реальность такого постулата подтверждалась описанной ранее возможностью связи между главной системой гистосовместимости и рядом психических заболеваний, в частности шизофренией и маниакально-депрессивным психозом.

Типирование больных, страдающих полинаркоманиями и алкоголизмом, позволило выявить некоторые особенности в распределении трансплантационных антигенов у обеих групп больных (табл. 10) [Майский А. И. и др., 1980].

Из представленных в табл. 10 данных следует, что частота встречаемости антигенов локуса A близка таковой к контрольным величинам как в группе больных алкоголизмом, так и наркоманиями. Среди антигенов локуса B с повышенной частотой встречаются у больных алкоголизмом HLA-B5, HLA-B12 и HLA-B14 (коэффициент относительного риска составляет 2,44, 1,65

Таблица 10

Особенности распределения HLA-антигенов у больных алкоголизмом и полинаркоманией

Антигены	Контроль (n-126) частота встречаемости, %	Больные алкоголизмом (n-117)		Больные полинаркоманией (n-59)	
		частота, встречае- мости, %	коэффици- ент отно- сительного риска	частота встречае- мости, %	коэффици- ент отно- сительного риска
HLA-A1	30	27	0,84	25	0,79
HLA-A2	48	49	1,01	49	1,03
HLA-A3	17	20	1,22	14	0,74
HLA-A9	21	24	1,15	22	1,04
HLA-A10	22	24	1,10	29	1,42
HLA-A11	18	20	1,10	20	1,14
HLA-A28	8	6	0,74	5	0,62
HLA-B5	12	25	2,44*	37	4,00*
HLA-B7	24	23	0,96	20	0,82
HLA-B8	12	9	0,77	10	0,84
HLA-B12	17	25	1,65	12	0,67
HLA-B13	14	16	1,16	15	1,08
HLA-B14	4	8	2,02	12	3,26
HLA-B15	11	15	1,46	12	1,00
HLA-BE17	5	7	1,47	14	3,14
HLA-B27	6	8	0,80	9	1,37
HLA-BE35	19	18	0,93	20	1,09
HLA-B40	15	14	0,89	12	0,76
HLA-CW4	20	26	1,39	42	2,97*

* Данные статистически достоверны.

и 2,02 соответственно). В группе больных полинаркоманиями чаще выявляются следующие антигены локусов В и С: HLA-B5, HLA-B14, HLA-BW117 и HLA-CW4 (коэффициенты относительного риска соответствуют 4, 3,26, 3,14 и 2,97). Статистически достоверно по критерию χ^2 отклоняются от нормального распределения только HLA-B5 (в обеих группах больных) и HLA-CW4 (в группе больных полинаркоманиями). Повышенная встречаемость HLA-B14, по-видимому, свидетельствует о наличии цирротических изменений печени у больных обеих групп, учитывая ранее выявленную ассоциацию данного антигена с алкогольным циррозом печени [Betancor L. P., et al., 1977].

Следует отметить, что анализ трансплантационных антигенов в настоящее время пытаются использовать

как инструмент для определения гомогенности гистогических форм заболеваний. В некоторых случаях, в частности шизофрении, условное разделение заболеваний на отдельные формы и недостаточная четкость их критериев выявляется только при типировании HLA-антигенов. Так, найденная при типировании общего контингента больных ассоциация шизофрении с главной системой гистосовместимости не обнаруживается при обследовании больных, разделенных по формам заболевания. Напротив, совпадение маркерных антигенов, определяемых при алкоголизме и полинаркоманиях, свидетельствуют в пользу единого генеза обоих заболеваний и подтверждает существование общих генетических механизмов, обуславливающих предрасположение к наркотическим препаратам различного химического строения. Другой аспект проблемы заключается в идентификации конкретного патофизиологического механизма, лежащего в основе подобной ассоциации.

Повышенная частота встречаемости антигена HLA-B5 зарегистрирована ранее при некоторых заболеваниях различной этиологии. Ассоциация антигена HLA-B5 с болезнью Бюргера — патологией периферических сосудов — встречается наиболее часто у злостных курильщиков и трактуется как проявление генетической связи данного антигена с патологическим пристрастием к курению табака [McLoughlin G. A. et al., 1977].

Наибольший интерес в связи с настоящим исследованием представляет значительное повышение HLA-B5 у больных шизофренией и детей с инфантильным психозом [Golse B. et al., 1977]. Последнее заболевание в нашей стране классифицируется как детская шизофрения. Памятуя о хорошо известных личностных и характерологических особенностях больных наркоманией, можно допустить, что в наших исследованиях речь идет о выявлении генетических маркеров повышенной предрасположенности к наркотизации у психопатологически измененной личности.

В настоящее время существует обоснованное предположение, что в большом проценте случаев алкоголизм и другие виды наркоманий развиваются на фоне предсуществующей психической патологии. Несомненно, что типирование больных по HLA-антигенам в комплексе с клиническим и психологическим обследованием позволит выделить специфические формы алкоголизма и ток-

сикоманий и индивидуализировать фармакотерапию. Непосредственная же связь системы HLA с психическими заболеваниями и токсикоманиями может осуществляться как результат патологического связывания биологически значимых эндогенных лигандов (гормонов, нейромедиаторов, нейропептидов) с маркерными антигенами, выступающими в силу своего структурного подобия в качестве псевдоресепторов.

Таким образом, в настоящее время намечены пути к экспериментальному обоснованию единого генеза всех видов наркоманий, который, по-видимому, включает в себя в качестве первичного звена взаимодействие (прямое или физиологически сопряженное) со специфическими рецепторами, приводящее к дисфункции биологически важных систем. Идентификация генетических локусов, контролирующих эти процессы, необходима для выявления индивидуумов с наследственно закодированной неустойчивостью к наркотическим соединениям.

В то же время, несмотря на значительные успехи, достигнутые генетиками в экспериментальной наркологии, основной вопрос об идентификации самих генетических детерминант и их маркеров до сих пор не решен. Этому во многом препятствуют чисто методические трудности. Действительно, в настоящее время для изучения генетических различий используют стандартные линии или выводят специальные линии лабораторных животных, отличающиеся по тысячам генов. В этой связи трудно или почти невозможно отыскать среди них именно те, которые оказываются максимально значимыми для восприимчивости организма к наркотикам.

По-видимому, использование или создание моделей с минимальными генетическими различиями частично поможет решению этой задачи. Гипотетически это могут быть линии, мутантные по генам, которые кодируют синтез ключевых ферментов, вовлекаемых в сложный механизм действия наркотиков. Безусловно, до конца не исчерпаны возможности такой генетической модели, которую представляют собой конгенно-резистентные линии мышей. Использование этих линий в фундаментальных фармакологических исследованиях может помочь решению проблемы ассоциации главной системы гистосовместимости с чувствительностью организма к различным наркотическим веществам.

ПОСЛЕСЛОВИЕ

Интенсивное изучение биологических механизмов, способствующих развитию алкоголизма и наркоманий, проводимое в последние годы и не нашедшее в силу чисто технических факторов достаточного отражения в настоящей книге, подтверждает своевременность ее издания и актуальность рассматриваемых вопросов.

Проблема причинности при анализе алкоголизма и наркоманий занимает центральное место в биологии и медицине. Накопленный к настоящему времени большой экспериментальный материал и клинические наблюдения позволяют утверждать, что наряду со средовыми воздействиями в процессе развития наркотической зависимости принимают участие и гетерогенные генетический детерминированные биологические компоненты. Все эти факторы определяют многочисленные варианты течения, прогноза заболевания и эффективность фармакотерапии. Биологической основой такой неоднозначности ответа организма на наркотики и алкоголь является биохимический и биофизический полиморфизм, который, определяя в целом устойчивость популяции, одновременно создает основу и для существования более приспособленных и менее приспособленных к условиям среды особей. Таким образом, наркомании по своей сути являются болезнями предрасположения.

Рассматривая патогенетически значимые механизмы формирования наркотической зависимости, следует остановиться на исследованиях последних лет, свидетельствующих о возможности включения рецепторного звена при развитии алкоголизма. Установлено, что непосредственный механизм реализации биологических эффектов этанола включает в себя по крайней мере две возможности. С одной стороны, это непосредственное влияние молекулы спирта на протекание биохимических процессов и, с другой стороны, образование активных соединений в результате метаболизма этанола в организме. К подобным соединениям, образующимся путем конъюгации продукта окисления этанола — ацетальдеги-

да с серотонином или триптофаном, относятся индолоиды, тривиально называемые β -карболинами.

Показано, что при инкубации серотонина и ацетальдегида с гомогенатом головного мозга происходит образование 1-метил-6-окси-тетрагидро- β -карболинов. Более тонкими методами исследования удалось установить, что такие молекулы в мозге появляются и после потребления этанола [Rommelspacher H. et al., 1980]. Следует отметить, что в организме β -карболины могут формироваться и без участия экзогенного этанола путем конденсации триптофана, серотонина, 5-метокситриптамина и N-метилтриптамина с донором метильных групп при ферментативном метилировании 5-метилтетрагидрофолатом [Mandell L. W., 1974]. Однако при хронической алкоголизации значительно увеличивается концентрация 1-метил- β -карболинов, которые, как полагают, играют значительную роль в формировании зависимости от этанола. В свою очередь увеличение концентрации насыщенных β -карболинов может приводить к усиленному образованию ненасыщенных β -карболинов, которые, как предполагают, образуются в результате ферментативного дегидрирования ненасыщенных β -карболинов [Buckhott N. S., 1980]. Однако ферменты, катализирующие эти превращения, до настоящего времени не выделены. Значение β -карболинов при трактовке механизма действия этанола определяется обнаруженной у них разнообразной биологической активностью. Так, некоторые β -карболины обладают галлюциногенной активностью [Naganjo R., 1979]. Тетрагидро- β -карболины увеличивают степень предпочтения раствора этанола крысами в условиях свободного выбора [Myers R. D., Melcior C. L., 1977], хотя некоторые аналоги уменьшают потребление этанола. Ряд β -карболинов при введении в организм вызывают тремор, что используется в экспериментальной практике [Robertson H. A., 1980]. Показано также, что β -карболины являются конкурентными ингибиторами транспорта Na^+ [Buckhott N. S., 1980], ингибируют моноаминоксидазу типа А и могут использоваться как конкурентнодействующие ингибиторы этого фермента [Airaksinen M. M., Kari J., 1981]. Кроме того, β -карболины могут увеличивать концентрацию серотонина в головном мозге, ингибируя обратный захват нейромедиатора.

Известно, что серотонин играет значительную роль в развитии зависимости от этанола. Так, у беспородных

белых крыс, предрасположенных к потреблению 15% раствора этанола в условиях свободного выбора между спиртом и водой, увеличена концентрация серотонина в гипоталамусе и снижена в таламусе [Жуков В. Н. и др., 1982]. Имеются основания полагать, что при хроническом поступлении этанола в организм происходящее повышенное образование и накопление β -карболинов имеет определенное значение в проявлении симптомов абстиненции.

Особый интерес к изучению β -карболинов возник после обнаружения того, что ненасыщенные β -карболины, а именно 3-карбоксиэфиры β -карболинов, являются высокоаффинными лигандами бензодиазепиновых рецепторов, превышающих диазепам по активности в условиях специфического связывания *in vitro* с бензодиазепиновыми рецепторами [Muller W. E., 1981]. Высказано предположение, что метил- β -карболин является эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов [Rommelspacher H., 1980]. Более подробное изучение взаимодействия β -карболинов с бензодиазепиновыми рецепторами позволило говорить о двух подтипах этих рецепторов, один из которых может быть охарактеризован как специфический рецептор β -карболинов. Потенцирование действия бензодиазепинов этанолом, снятие симптомов алкогольной абстиненции бензодиазепиновыми транквилизаторами — все это может быть объяснено увеличенным синтезом β -карболинов при развитии физической зависимости от этанола. Обнаружено, что диазепам ингибирует тремор, вызванный гармалином, β -карболины ингибируют миорелаксирующее и противосудорожное действие бензодиазепинов, однако не влияют на анксиолитические свойства последних. Более того некоторые β -карболины обладают выраженными транквилизирующими свойствами при анализе их эффекта в антиконфликтном тесте.

Проводимое в различных лабораториях изучение влияния β -карболинов на потребление этанола экспериментальными животными не привело к однозначным результатам, что, по-видимому, связано с использованием различных методических подходов при моделировании хронического алкоголизма. Весьма вероятно, что роль β -карболинов может меняться на разных этапах формирования зависимости от этанола. Так, если на начальных этапах повышенного образования β -карболинов может формироваться влечение к этанолу, то при дли-

тельной алкоголизации они могут вызвать ряд симптомов абстиненции и таким образом отвечать за формирование абстинентного синдрома.

Важно подчеркнуть, что кроме обнаруженного взаимодействия β -карболинов с бензодиазепиновыми рецепторами, имеются сведения об этих соединениях как о конкурентах за связывание с рецепторами опиатов и серотонина [Airiksinen M. M., Mikhonen E., 1980]. Таким образом, хотя в настоящее время и нельзя представить исчерпывающую картину всей многогранной симптоматики, реализующейся через различный рецепторный аппарат при хронической алкоголизации, участие рецепторного звена в патогенезе алкоголизма представляется очевидным.

Учитывая важное значение нейропептидов в деятельности ЦНС, уделяется все возрастающее внимание их роли в патогенезе наркоманий и алкоголизма. Становится очевидным, что при этой патологии нарушения распространяются не только на опиоидные пептиды, такие как энкефалины и эндорфины, но и другие представители этой группы регуляторов гомеостаза. К ним, в частности, относится пептид, индуцирующий δ -сон (delta sleep-inducing peptide — DSIP); являющийся одним из эндогенных регуляторов циркадных ритмов и функционального состояния серотонинергической, норадреналинергической и дофаминергической систем мозга.

Проведенные нами [Буров Ю. В. и др., 1982] исследования содержания этого пептида в различных отделах головного мозга крыс, предрасположенных и не предрасположенных к развитию экспериментального алкоголизма, и изменения его концентрации под влиянием введения этанола позволили установить, что «короткоспящие» животные с длительностью этанолового наркоза порядка $85,3 \pm 19,1$ мин, являющиеся предрасположенными к развитию экспериментального алкоголизма [Буров Ю. В., 1982], имеют достоверно более низкий уровень этого пептида по сравнению с «долгоспящими» животными ($191,7 \pm 27,3$ мин). Исследование содержания DSIP в отдельных областях мозга показало, что у животных с предрасположенностью к этанолу снижено содержание нейропептида в коре больших полушарий и полосатом теле по сравнению с «долгоспящими» крысами. Определенные изменения в концентрации DSIP выявлены и при однократном введении этанола. При этом

наиболее значительно содержание нейропептида увеличивается в полосатом теле, таламусе и в меньшей степени в продолговатом мозге.

Обнаруженные особенности изменения концентрации DSIP в головном мозге под влиянием этанола у крыс с различной длительностью алкогольного наркоза и при однократном введении этанола явились предпосылкой для исследования содержания нейропептида при хроническом добровольном потреблении 15% раствора этанола в динамике. Учитывая, что в популяции беспородных белых крыс имеются особи с различной склонностью к потреблению этанола, для экспериментов были отобраны две группы животных. В одну группу были отнесены крысы, потребляющие $6,2 \pm 1,4$ мл/кг массы тела 15% раствора этанола («малопьющие» животные), другую группу составляли «многопьющие» крысы со среднесуточным потреблением алкоголя в пределах $56,3 \pm 8,7$ мл/кг. Оценка динамики изменения концентрации DSIP при различных сроках алкоголизации животных в условиях свободного выбора дала возможность установить, что в течение первых 2 мес различия между «многопьющими» и «малопьющими» крысами в содержании нейропептида в изученных областях не выявлены. По-видимому, данный факт можно рассматривать как некоторое компенсаторное повышение уровня DSIP у крыс, предрасположенных к развитию экспериментального алкоголизма. Действительно, при дальнейшей алкоголизации, когда формируется физическая зависимость от этанола, происходят истощение системы компенсации и снижение содержания DSIP в полосатом теле, продолговатом мозге, таламусе и коре больших полушарий. Следовательно, полученные нами данные позволяют обсуждать роль DSIP в механизмах действия этанола как при однократном введении, так и при формировании алкогольной зависимости. Возможно, что увеличение содержания нейропептида в условиях инъекции низкой дозы этанола обеспечивает известный транквилизирующий эффект алкоголя. Снижение же концентрации DSIP в процессе длительной хронической алкоголизации может иметь значение в нарушении соотношения фаз сна, сопровождающей развитие алкоголизма.

Качественно новая информация получена нами в последнее время и при обследовании больных алкоголизмом, проведенном совместно с В. Г. Тресковым в усло-

виях наркологического стационара. Рассматривая алкоголизм как мультифакториальное заболевание, клинически удалось установить, что в произвольно взятой группе, состоящей из 103 мужчин, страдающих хроническим алкоголизмом II стадии, у большинства больных выявляются относительно неглубокие расстройства психической деятельности, которые во многом определяют клиническую картину заболевания. На основании результатов подобного анализа больные были разделены на пять групп. В первую группу вошли больные, у которых не обнаружены психопатологические расстройства в момент обследования; во вторую группу были включены больные с наиболее легкими нарушениями по типу реактивных астенических или астено-субдепрессивных состояний; третью группу составили больные с реактивно спровоцированными или аутохтонно наступающими циклотимоподобными фазными расстройствами; в четвертую группу были включены больные с психопатоподобными расстройствами, среди которых преобладали эмоционально-взрывчатые проявления в сочетании с внутренним напряжением и тревогой; к пятой группы были отнесены больные с полиморфными атипичными аффективными расстройствами (апатические, адинамические, вялые субдепрессии). Типирование этих больных по HLA-антигенам позволило установить, что в третьей группе обследованных риск развития заболевания у носителей антигена HLA CW4 возрастает в 11,3 раза, а у носителей антигена HLA B5 в 5,38 раза. В пятой группе обследованных наибольший риск заболевания был у носителей антигена HLA B5 (в 7,8 раза), затем HLA A3 (в 3 раза) и HLA CW4 (в 2,5 раза).

Таким образом, полученные нами данные указывают, что предлагаемые нами HLA-антигены в качестве генетических маркеров предрасположенности к развитию алкоголизма позволяют в определенной степени решать вопрос о наличии возможных пограничных психических нарушений у больных и сочетать традиционное лечение алкоголизма с применением адекватных психотропных препаратов. Необходимо подчеркнуть, что дальнейшее тщательное изучение биологических закономерностей, определяющих формирование зависимости от наркотиков и алкоголя позволит вплотную подойти к вопросам профилактики и рациональной фармакотерапии этих заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андропова Л. М., Барков Н. К. Особенности формирования и течения экспериментального хронического алкоголизма в зависимости от пола.— Фармакол. и токсикол., 1978, № 1, с. 71—76.
- Андропова Л. М., Барков Н. К. Значение половых отличий и изменение половой функции при наркоманиях и их лечении.— Фармакол. и токсикол., 1981, № 3, с. 362—376.
- Арчаков А. И. Микросомальное окисление.— М.: Наука, 1975.
- (Арчаков А. И., Карузина И. И., Тверитинов В. М., Кокарева И. С.) Archakov A. I., Karuzina I. I., Tveritinov V. M., Kokareva I. S. Hydroxylation of aniline and aminoatipyrine (1-phenyl-2,3-dimethylaminopyrazolone-5) derivatives in liver endoplasmatic reticulum.— Biochem. Pharmacol., 1974, vol. 23, p. 1053—1063.
- Ашмарин И. П., Ерошкин М. Б., Ковалева Т. А., Рожанец В. В. Олигопептиды мозга — аналгетики, стимуляторы памяти и сна.— Молекулярная биол., 1978, № 12, с. 965—979.
- Бабичев В. Н., Миронов С. Ф. Нейропептиды мозга и их нейроэндокринные эффекты.— Пробл. эндокринолог., 1978, № 3, с. 78—85.
- Вартанян М. Е., Лидеман Р. Р. Опиатные рецепторы и эндогенные морфины: новый подход к исследованию мозга.— Журн. невропатол. и психиатр., 1978, № 4, с. 519—529.
- Ведерникова Н. Н., Волов В. А., Шошина С. В. Иммуногенетический контроль формирования наркотической зависимости к опиатам.— В кн.: Проблемы теоретической и клинической иммунологии и иммунохимии. М., 1978, с. 11—15.
- Ведерникова Н. Н., Майский А. И. Опиаты и эндогенные морфиноподобные пептиды: системный подход к оценке их роли в интеграции нервной и эндокринной регуляции.— Успехи совр. биол., 1981, № 3, с. 380—392.
- Гегенава Г. П., Чистяков В. В. Влияние морфина *in vitro* на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени крыс.— Бюлл. exper. биол., 1975, № 10, с. 77—79.
- Гегенава Г. П., Чистяков В. В. Влияние морфина и его производных на электропроводность искусственных фосфолипидных мембран.— Биофизика, 1979, № 1, с. 67—71.
- Евтодченко Ю. В., Медведев Б. И., Кудзина Л. Ю. и др. Идентификация соединения, индуцирующего транспорт ионов калия в митохондриях и бислойных липидных мембранах.— Докл. АН СССР, 1977, т. 233, № 4, с. 708—711.
- Елецкий Ю. К. Влияние острой алкогольной интоксикации на распределение и активность сукцинатдегидрогеназы и цитохром-оксидазы в печени крыс.— Арх. пат., 1968, № 8, с. 63—66.

- Елецкий Ю. К. Влияние острой алкогольной интоксикации на окислительное фосфорилирование в печени крыс.— Фармакол. и токсикол., 1972, № 2, с. 198—199.
- Клуша В. Е. Психотропные свойства некоторых гипофизарных пептидных гормонов.— Хим.-фарм. журн., 1978, № 3, с. 3—15.
- Клуша В. Е., Свирский Ш. В., Муцениеце Р. К. и др. Центральные эффекты С-концевых фрагментов гастрина.— Хим.-фарм. журн., 1979, № 7, с. 24—31.
- Майский А. И., Ведерникова Н. Н. Генетический контроль чувствительности экспериментальных животных к наркотикам.— Успехи совр. биол., 1979, № 2, с. 199—214.
- Майский А. И., Ведерникова Н. Н., Волов В. А. Участие системы Н-2 в регуляции чувствительности мышей к морфину.— Бюлл. эксперим. биол., 1978, № 6, с. 688—690.
- Майский А. И., Ведерникова Н. Н., Ведерников А. А., Шошина С. В. Генетическая регуляция чувствительности к наркотикам: роль главной системы совместимости тканей мыши и человека.— В кн.: Материалы 14-го Международного генетического конгресса. М., 1978, с. 351—354.
- Майский А. И., Ведерникова Н. Н., Ведерников А. А. и др. Связь главной системы гистосовместимости мыши и человека с предрасположенностью организма к развитию наркотической зависимости.— Бюлл. exper. биол., 1980, № 11, с. 596—598.
- Майский А. И., Клуша В. Е., Ведерникова Н. Н. и др. Энкефалины и фрагменты гастрина: возможность существования различных механизмов анальгезии.— Бюлл. эксп. биол., 1981, № 4, с. 456—458.
- Мартиус К. Витамин К-редуктаза, ее свойства и возможная роль в клеточном дыхании.— В кн.: Труды V Международного биохимического конгресса, 1962, симп. V, с. 239—248.
- Машковский М. Д. Биологические аспекты и перспективы развития современной психофармакологии.— Вестн. АМН СССР, 1979, № 7, с. 48—54.
- Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений.— М.: Медицина, 1973.
- Ратникова Л. А., Чистяков В. В. Возможный биохимический механизм токсического действия барбитуратов.— Биохимия, 1978, № 11, с. 1989—1993.
- Ратникова Л. А., Чистяков В. В., Ягужинский Л. С. Регуляторные взаимодействия дыхательной цепи митохондрий и окислительной системы эндоплазматического ретикулума.— Биохимия, 1978, № 10, с. 1809—1815.
- Сергеев П. В., Ведерникова Н. Н., Майский А. И. Является ли индукция микросомальных ферментов печени причиной толерантности к барбитуратам? — Фармакол. и токсикол., 1976, № 2, с. 208—210.
- Сергеев П. В., Ведерникова Н. Н., Арчаков А. И., Майский А. И. Механизм индукции барбитуратами ферментных систем, метаболизированных лекарственными соединениями.— Фармакол. и токсикол., 1973, № 3, с. 365—371.
- Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке.— М.: Наука, 1969.
- Фисенко В. П., Чиченков О. Н., Аляутдин Р. Н. О влиянии лейцин-энкефалина на межнейронную передачу возбуждения.— Бюлл. exper. биол., 1979, № 6, с. 556—558.

- Чистяков В. В., Гегенсва Г. П. О механизме ингибирования окислительного фосфорилирования в митохондриях.— Биохимия, 1976, № 7, с. 1272—1278.
- Чистяков В. В., Гегенсва Г. П. Изучение механизма индукции изменения проницаемости митохондриальных мембран для ионов калия.— Биохимия, 1980, № 3, с. 492—497.
- Чистяков В. В., Чернобровкина Т. В., Ратникова Л. А., Поспелова Л. Н. Динамика изменений окислительных систем микросом и митохондрий печени крыс при хроническом введении фенобарбитала.— Биохимия, 1974, № 5, с. 984—990.
- Чистяков В. В., Ратникова Л. А., Лаврецкая Э. Ф., Чугунов В. В. Влияние аминазина, фенобарбитала и их сочетания на активность гидроксилазной системы печени и на фармакологический эффект этих препаратов.— Фармакол. и токсикол., 1977, № 4, с. 438—441.
- Чиченков О. Н. Эндогенные полипептиды с морфиноподобной активностью (энкефалины, эндорфины, анодинин).— Фармакол. и токсикол., 1978, № 12, с. 245—256.
- Austen B. M., Smyth D. G., Snell C. R. β -Endorphin, α -endorphin and met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C fragment.— Nature, 1977, vol. 269, p. 619—621.
- Baran A., Shuster L., Eleftheriou B. E. Opiate receptors and analgesic response in mice basis for genetic difference.— Fed. Proc., 1975, vol. 34, p. 714—719.
- Baraona E., Lieber C. S. Effects of ethanol on lipid metabolism.— J. Lipid. Res., 1979, vol. 20, p. 289—315.
- Beckett A. H., Casy A. F. Synthetic analgesics: stereochemical considerations.— J. Pharm. Pharmacol., 1954, vol. 6, p. 986—1001.
- La Bella F., Kim K. S., Templeto J. Opiate receptor binding activity of 17α -estrogenic steroids.— Life Sci., 1978, vol. 23, p. 1797—1804.
- Bleich H. E., Cutnell J. D., Day A. R. et al. Preliminary analysis of ^1H and ^{13}C spectral and relaxation behaviour on metionin enkephalin.— Proc. nat. Acad. Sci. USA, 1976, vol. 73, p. 2589—2593.
- Blum K., Futterman S., Wallace J. E., Schwertner H. A. Naloxone-induced inhibition of ethanol dependence in mice.— Nature, 1977, vol. 265, p. 49—51.
- Bradbury A. F., Smyth D. G., Snell C. R. C-fragment of lipotropin has a high affinity for brain opiate receptors.— Nature, 1976a, vol. 260, p. 793—795.
- Brewster H. Ethanol preferences in strains of rats, selectively bred for behavioral characteristics.— J. Genet. Psychol., 1969, vol. 36, p. 161—163.
- Caldwell J., Croft J. E., Smith R. L. On the mechanism of tolerance to pentobarbitone, evidence against a role for enzyme induction.— Brit. J. Pharmacol., 1978, vol. 62, N 3, p. 147—151.
- Castellano C., Llovera B. E., Oliverio A. Morphine induced running and analgesia in two strains of mice following septal lesions of modification of brain amines.— Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1975a, Bd 288, S. 355—370.
- Castellano C., Oliverio A. A genetic analysis of morphine induced running and analgesia in the mice.— Psychopharmacologia (Berl.), 1975, Bd 41, S. 197—200.

- Catz C., Yaffe S. J. Strain and age variations in hexobarbital response.—*J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1967, vol. 155, p. 152—156.
- Cederbaum A. J., Rubin E. Molecular injury to mitochondria produced by ethanol and acetaldehyde.—*Fed. Proc.*, 1975, vol. 34, p. 2045—2051.
- Cederbaum A. J., Lieber C. S., Rubin E. Effects of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions damage to coupling site I.—*Arch. Biochem.*, 1974, vol. 165, p. 560—569.
- Cho T. M., Cho J. S., Loh H. H. A model system for opiate-receptor interactions: mechanism of opiate-cerebroside sulfate interaction.—*Life Sci.*, 1975, vol. 18, N 2, p. 231—244.
- Cho T. M., Cho J. S., Loh H. H. Physiochemical basis of opiate-cerebroside sulfate interaction and its application to receptor theory.—*Molec. Pharmacol.*, 1976, vol. 16, p. 393—405.
- Cicero T., Bell R., Meyer E., Schweister T. Narcotics and the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: acute effects on luteinizing hormone, testosterone and androgen-dependent systems.—*J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1977, vol. 201, N. 1, p. 76—84.
- Collins M. A., Bigdeli M. G. Tetrahydroisoquinolines in vivo. I. Rat brain formation of salsolinol, a condensation product of dopamine and acetaldehyde, under certain conditions during ethanol intoxication.—*Life Sci.*, 1975, vol. 16, p. 585—602.
- Costa E., Carenzy A., Guidotti A., Reveulta A. Narcotic analgesics and the regulations of neuronal catecholamine stores.—In: *Frontier of catecholamines research*/Ed. E. Usdin, S. Snyder. London, 1973, p. 1003—1010.
- Coyle J. T., Pert C. B. Ontogenetic development of ^3H -naloxone binding in rat brain.—*Neuropharmacology*, 1976, vol. 15, N. 9, p. 555—560.
- Cox B. M., Opheim K. E., Teschemacher H., Goldstein A. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties.—*Life Sci.*, 1975, vol. 16, N. 12, p. 1777—1782.
- Creese J., Snyder S. H. Receptor binding and pharmacological activity of opiates in the guinea-pig intestine.—*J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1975, vol. 194, p. 205—219.
- Cusan L., Dupont A., Kledrik G. et al. Potent prolactin and growth hormone releasing activity of more analogues of met-enkephalin.—*Nature*, 1977, vol. 268, N. 5620, p. 544—547.
- Damjanovich R. P., McInnes J. W. Factors involved in ethanol narcosis: analysis in mice of three inbred strains.—*Life Sci.*, 1973, vol. 13, p. 55—65.
- Eriksson K., Kiianmaa K. Genetic analysis of susceptibility to morphine addiction in inbred mice.—*Ann. Med. exp. Fen.*, 1971, vol. 49, p. 73—77.
- Feinberg A. P., Creese J., Snyder S. H. The opiate receptor: a model explaining structure-activity relationships of opiate agonists and antagonists.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, vol. 73, N. 11, p. 4215, 4219.
- Ferland L., Fuxe K., Enerath P. et al. Effects of methionine-enkephalin on prolactin release and catecholamine levels and turnover in the median eminence.—*Europ. J. Pharmacol.*, 1977, vol. 43, N. 1, p. 89—90.
- Frederickson R. C. A. Morphine withdrawal response and central cholinergic activity.—*Nature*, 1975, vol. 257, p. 131—132.

- Fürst Z., Foldes F. F., Knole I. The influence of naloxone on barbiturate anesthesia and toxicity in the rat.—Life Sci., 1977, vol. 20, p. 921—924.
- Galt H. B. The opiate anomalies—another possible explanation? —J. Pharm. Pharmacol., 1977, vol. 29, p. 711—714.
- Garbay-Janreginberry C., Rogens B. P., Oberlin R. Preferential conformation of the endogenous opiate-like pentapeptides met-enkephalin in DMSO-D₆ solution determined by high field ¹H-NMR.—Biochem. biophys. Res. Commun., 1976, vol. 71, p. 558—565.
- Gillan M. G. C., Kosterlitz H. W., Paterson S. J. Comparison of the binding characteristics of tritiated opiates and opioid peptides.—Brit. J. Pharmacol., 1979, vol. 66, p. 86—87.
- Gintzler A. R., Levy A., Spector S. Antibodies as a means of isolating and characterizing biologically active substances: Presence of a non-peptide, morphine-like compound in the central nervous system.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, vol. 73, N. 6, p. 2132—2136.
- Goldstein A., Goldstein T. S., Cox B. M. A synthetic peptide with morphine-like pharmacologic action.—Life Sci., 1975, vol. 17, p. 1643—1654.
- Graf L., Kenessey A., Berzetei T., Rónai A. Z. Demonstration of β -lipotropin activating enzyme in porcine pituitary.—Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, vol. 78, N. 3, p. 1114—1123.
- Haddox M. H., Russel D. H. β -Endorphin is a kidney trophic hormone.—Life Sci., 1979, vol. 25, N. 7, p. 615—620.
- Harsing L. G., Vizi E. S., Knoll Y. Increase by enkephalin of acetylcholine release from striatal slices of the rat.—Pol. J. Pharmacol. Pharm., 1978, vol. 30, p. 387—395.
- Havemann U., Kuschinsky K. Effects of opiates on cGMP in homogenates and slices of rat striata.—Pharmacology, 1978, vol. 16, N. 5, p. 295—299.
- Hazum E., Chang K.-J., Cuatrecasas P. Specific nonopiate receptors for β -endorphin.—Science, 1979, vol. 205, p. 1033—1035.
- Heston W. D., Erwin V. C. A comparison of the effects of alcohol on mice selectively bred for difference in ethanol sleeptime.—Life Sci., 1974, vol. 14, p. 365—370.
- Ho A. K., Tsai C. S., Kissin B. Neurochemical correlates of alcohol preference in inbred strains of mice.—Pharmacol. Biochem. Behav., 1975, vol. 3, N. 6, p. 1073—1076.
- Höllt V., Herz A. In vivo receptor occupation by opiates and correlation to the pharmacological effect.—Fed. Proc., 1978, vol. 37, N. 2, p. 158—161.
- Hughes H. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine.—Brain Res., 1975, vol. 88, p. 295—308.
- Hughes P. Enkephalins as neurotransmitters.—«Int. Workshop. Conf. „Endorphins 78“». Eds. Graf L., Pulkovits M., Rónai A. Z., Budapest, 1978, p. 157—175.
- Jaconet Y. F., Klee W. A., Rice K. C. et al. Stereospecific and non-stereospecific effects of (+) and (–) morphine: evidence for a new class of receptors? —Science, 1977, vol. 198, N. 4319, p. 842—844.

Kakih
t
p
Kang
e
m
Kakih
si
vo
Kanga
ke
m
p.
Karras
ev
ma
Kato Y
tin
Bio
Kolb V
N.
Kosterl
cha
tors
Kramer
the
met
p.
Kream
keph
N. 1
Kurijama
tyric
activ
anal
p. 1
Lee N. A
tor.—
Lee C. M
dopa
p. 16
Levin R.
hibit
brain
Lieber C.
1973)
Loh H. H
side
Life S
Lowney L
with
Martin W
p. 46

- Kakihana K., Brown D., McClearn G., Tabershaw J. R. Brain sensitivity to alcohol in inbred mouse strains.— *Science*, 1966, vol. 154, p. 1574—1575.
- Kangawa K., Malsuo H., Igarashi M. Neo-endorphin: "A big" leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalamic.— *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1979, vol. 86, N. 1, p. 153—160.
- Kakihana K., Brown D., McClearn G., Tabershaw J. R. Brain sensitivity to alcohol in inbred mouse strains.— *Science*, 1966, vol. 154, p. 1574—1575.
- Kangawa K., Matsuo H., Igarashi M. Neo-endorphin: "A big" leu-enkephalin with potent opiate activity from porcine hypothalamic.— *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1979, vol. 86, N. 1, p. 153—160.
- Karras P. J., North R. A. Inhibition of neuronal firing by opiates evidence against the involvement of cyclic nucleotides.— *J. Pharmacol. (Paris)*, 1979, vol. 65, p. 647—652.
- Kato Y., Iwasaki Y., Abe H. et al. Effects of endorphine on prolactin and growth hormone secretion in rats.— *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1978, vol. 158, N. 3, p. 431—436.
- Kolb V. M. New opiate-receptor model.— *J. pharm. Sci.*, 1978, vol. 67, N. 7, p. 999—1001.
- Kosterlitz H. W., Leslie F. M. Comparison of the receptor binding characteristics of opiate agonists interacting with or K-receptors.— *J. Pharmacol. (Paris)*, 1978, vol. 64, p. 607—614.
- Kramer R. E., Greiner J. W., Rumbaugh R. C. et al. Requirement of the pituitary gland for gonadal hormone effects on hepatic drug metabolism in rats.— *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 1979, vol. 208, p. 19—23.
- Kream R. M., Zukin R. S. Binding characteristics of a potent enkephalin analog.— *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 1979, vol. 90, N. 1, p. 99—109.
- Kurijama K., Ionedo J. Morphine induced alterations of γ -aminobutyric acid and taurine contents and L-glutamate decarboxylase activity in rat pinal cord and thalamus: possible correlated with analgesic activity of morphine.— *Brain Res.*, 1978, vol. 148, p. 163—179.
- Lee N. M., Smith A. P. A protein-lipid model of the opiate receptor.— *Life Sci.*, 1980, vol. 26, p. 1459—1464.
- Lee C. M., Wong R. C. L. Effects of morphine on the rat striatal dopamine metabolism.— *Biochem. Pharmacol.*, 1979, vol. 28, p. 163—170.
- Levin R. M., Weiss B. Mechanism by which psychotropic drugs inhibit adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase of brain.— *Molec. Pharmacol.*, 1976, vol. 12, p. 581—589.
- Lieber C. S. Hepatic and metabolic effects of alcohol (1966 to 1973).— *Gastroenterology*, 1973, vol. 65, p. 821—846.
- Loh H. H., Who M. M., Wu Y. C. et al. Opiate binding to cerebroside sulfate: a model system for opiate-receptor interaction.— *Life Sci.*, 1975, vol. 16, p. 1811—1818.
- Lowney L. I., Gentleman S. B., Goldstein A. A pituitary endorphine with novel properties.— *Life Sci.*, 1979, vol. 24, p. 2377—2384.
- Martin W. R. Opioid antagonists.— *Pharmacol. Rev.*, 1967, vol. 19, p. 463—521.

- Mayskii A. I., Vedernikova N. N. Analysis of the factors part in the regulation of sensitivity to narcotics.—In: International congress on alcoholism and drug dependence. Warszawa, 1974, p. 94—98.
- McClearn G. E. Genetics and the pharmacology of alcohol. In: Proceedings 6th Int. Congress of Pharmacology, Oxford, 1976, vol. 3, p. 59—66.
- Meglio M., Hosobuchi Y., Loh H. H. et al. β -Endorphin: behavioral and analgesic activity in rats.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, p. 774—776.
- Miller R. J., Chang K.-J., Cuatrecasas P. The metabolic stability of the enkephalins.—Biochem. biophys. Res. Commun., 1977, vol. 74, N. 4, p. 1311—1317.
- Moroni F., Cheney D. L., Peralta E., Costa E. Opiate receptor against as modulators of γ -aminobutyric acid turnover in the nucleus caudatus, globus pallidus and substantia nigra of rat.—J. Pharmacol. exp. Ther., 1978, vol. 207, N. 3, p. 870—877.
- Oliverio A., Castellano C. Genotype-dependent sensitivity and tolerance to morphine and heroin: dissociation between opiate-induced running and analgesia in the mouse.—Psychopharmacologia (Berl.), 1974, Bd 39, S. 13—22.
- Opmeer F. A., Ree Van J. M. Competitive antagonism of morphine action in vitro by calcium.—Europ. J. Pharmacol., 1979, vol. 53, p. 395—397.
- Orrenius S., Ericsson J. L. E., Ernster L. Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-metabolizing enzyme system and its relationship to the proliferation of endoplasmic membranes. A morphological and biochemical study.—J. Cell. Biol., 1965, vol. 25, p. 627—635.
- Pasternak G. W., Goodman R., Snyder S. H. An endogenous morphine-like factor in mammalian brain.—Life Sci., 1975, vol. 16, N. 12, p. 1765—1769.
- Pepeu G., Casamanti F., Pedata F. Neurotransmitters and opiate addiction.—Proc. Eur. Soc. Neurochem. 2nd Meet ESN, Göttingen, 1978, Weinheim—New York, 1978, p. 425—438.
- Pert C. B., Snyder S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue.—Science, 1973, vol. 179, N. 4077, p. 1011—1014.
- Pert C. B., Snyder S. H. Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium.—Molec. Pharmacol., 1974, vol. 10, p. 868—869.
- Pert C. B., Aposhian D., Snyder S. H. Phylogenetic distribution of opiate receptor binding.—Brain Res., 1974, vol. 75, p. 356—361.
- Pert C. B., Kuhar M. J., Snyder S. H. Autoradiographic localization of the opiate receptor in rat brain.—Life Sci., 1975, vol. 16, N. 12, p. 1849—1854.
- Pert C. B., Pert A., Tallman J. F. Isolation of novel endogenous opiate analgesic from human blood.—Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, vol. 73, N. 7, p. 2226—2230.
- Pinsky C., Koven S. J., La Bella F. Evidence for role of endogenous sex steroids in morphine antinociception.—Life Sci., 1975, vol. 16, p. 1785—1786.
- Raskin N. H. Alcohol dehydrogenase in brain: a toxicological role.—Ann. N. Y. Acad. Sci., 1973, vol. 215, p. 39—53.

- Rees D. E. The mechanism of induction of the microsomal drug hydroxylating system in rat liver by phenobarbital.—*Gen. Pharmac.*, 1979, vol. 10, p. 341—350.
- Rodgers D. A., McClearn G. E. Mouse strain differences in preference for various concentrations of alcohol.—*Quart. J. Stud. Alcohol.*, 1962, vol. 23, p. 26—33.
- Ronai A. Z., Berzetei I. Similarities and differences of opioid receptors in different isolated organs.—«*Int. Workshop. Conf. „Endorphins 78“*», Eds. L. Craf et al., Budapest, 1978, p. 237—257.
- Rubin E., Cederbaum A. J. Effect of chronic ethanol feeding and acetaldehyde on mitochondrial functions and the transfer of reducing equivalents.—In: *Alcohol and aldehyde metabolizing systems*. New York, 1974, p. 435—455.
- Rubin E., Lieber C. S. Alcoholism, alcohol and drugs.—*Science*, 1971, vol. 172, p. 1097—1102.
- Schulz R., Herz A. Naloxone-precipitated withdrawal reveals sensitization to neurotransmitters in morphine tolerant/dependent rats.—*Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1977, Bd 299, S. 95—99.
- Shuster L., Webster G. W., Yu G., Eleftheriou B. E. A genetic analysis of the response to morphine in mice: analgesia and running.—*Psychopharmacologia (Berl.)*, 1975, Bd 42, N. 3, S. 249—254.
- Simantov R., Snyder S. H. Morphine-like peptides, leucine enkephalin and methionine enkephalin: interactions with the opiate receptor.—*Molec. Pharmacol.*, 1976, vol. 12, p. 987—998.
- Simantov R., Childers S. R., Snyder S. H. [^3H]-opiate binding: anomalous properties in kidney and liver membranes.—*Molec. Pharmacol.*, 1978, vol. 14, p. 69—76.
- Simantov R., Childers S. R., Snyder S. H. The opiate receptor binding interactions of ^3H -methionine enkephalin, an opioid peptide.—*Europ. J. Pharmacol.*, 1978, vol. 47, p. 319—331.
- Simantov R., Kuhar M. J., Ihl G. R., Snyder S. H. Opioid peptide enkephalin: immunohistochemical mapping in rat central nervous system.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, N. 5, p. 2167—2171.
- Simon M., George R., Garcia J. Chronic morphine effects of regional brain amines, growth hormone and corticosterone.—*Europ. J. Pharmacol.*, 1975, vol. 34, p. 27—38.
- Sladek N. E., Chaplin M. D., Mannering G. J. Sex-dependent differences in drug metabolism in the rat. IV. Effect of morphine administration.—*Drug. Metabol. Dispos.*, 1974, vol. 2, p. 293—300.
- Snyder S. H. Opiate receptor in normal and drug altered brain function.—*Nature*, 1975, vol. 257, p. 185—189.
- Snyder S. H. Neurotransmitter and drug receptor in the brain.—*Biochem. Pharmacol.*, 1975, vol. 24, p. 1371—1374.
- Snyder S. H., Simantov R. The opiate receptor and opioid peptides.—*J. Neurochem.*, 1977, vol. 28, p. 13—20.
- Squires R. F., Braester C. Characteristics and regional distributions of two distinct [^3H]-naloxone binding sites in the rat brain.—*J. Neurochem.*, 1978, vol. 30, p. 231—236.

- Terenius L., Wahlström A. Search for an endogenous ligand for the opiate receptor.—*Acta physiol. scand.*, 1975, vol. 94, p. 74—81.
- Terenius L., Gispen W. H., De Wied D. ACTH-like peptides and opiates receptor in the rat brain: structure activity studies.—*Europ. J. Pharmacol.*, 1975, vol. 33, p. 395—399.
- Terenius L., Wahlstrom A., Lindstrom L., Widerlow C. Increased CSF levels of endorphines in chronic psychosis.—*Neurosci. Letters*, 1976, vol. 3, p. 157—162.
- Teschemacher H., Opheim K. E., Cox B. M., Goldstein B. A. A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. I. Isolation.—*Life Sci.*, 1975, vol. 16, N. 12, p. 1771—1775.
- Thyrum P. T., Thyrum E. M., Luchi R. J. Membrane phospholipid-calcium complex: possible common site of action of local anesthetics and narcotics.—*Pharmacologist*, 1971, vol. 13, p. 21—214.
- Tipton K. F., Rivett A. J., Smith I. L. Pathways of alcohol metabolism.—*Proc. Eur. Soc. Neurochem. 2nd Meet.*, Göttingen, 1978, Weinheim—New York, 1978, p. 332—345.
- Tsogai Y., Nementhy O., Scheraga H. A. Enkephalin: conformational analysis by means of empirical energy calibrations.—*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 14, N. 2, p. 414—418.
- Van Ree J. M., Niesink P. J. Pituitary-adrenal axis and oral morphine consumption in rats.—*Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1978, vol. 9, N. 4, p. 493—498.
- Vedernikova N. N., Kim A. A., Mayskii A. I. On the question of specificity of steroid interaction with liver cytoplasmic receptors.—*In: I. Internat. Congr. on hormones and cancer. Rome, 1979.*
- Wei E. T., Tsen L. F., Loh H. H., Li C. H. Comparison of the behavioral effects of β -endorphin and enkephalin analogs.—*Life Sci.*, 1977, vol. 21, p. 321—328.
- De Wied D., Kovács G. L., Bohus B. et al. Neuroleptic activity of the neuropeptide β -LPH₆₂₋₇₇ (Des Tyr¹ γ -endorphin; DT E).—*Europ. J. Pharmacol.*, 1978, vol. 49, p. 427—429.
- Wong C. L., Roberts M. B. The possible role of brain histamine and H₁- and H₂-receptors in the development of morphine tolerance and physical dependence in mice.—*Agents Actions*, 1975, vol. 5/5, p. 476—484.
- Worsham E. D., Freed E. X., Lochry E. A., Riley E. P. Generality of differential sensitivity to alcohol in selectively bred rats.—*Physiol. Psychol.*, 1977, vol. 5, N. 4, p. 429—432.
- Yaguzhinsky L. S., Smirnova E. G., Ratnikova L. A. et al. Hydrophobic sites of the mitochondrial electron transfer system.—*J. Bioenergetics*, 1973, vol. 5, p. 163—174.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Буров Ю. В. Пути поиска фармакологических средств в лечении алкоголизма.—*Вестн. АМН СССР*, 1982, № 5, с. 72—77.
- Буров Ю. В., Юхананов Р. Ю., Майский А. И. Содержание пептида, индуцирующего дельта-сон (DSIP) в мозге крыс с различным уровнем алкогольной мотивации.—*Бюлл. exper. биол.*, 1982, № 9, с. 67—70.

- Жуков В. Н., Ходорова Н. А., Буров Ю. В. Концентрация серотонина в мозге крыс с различной предрасположенностью к потреблению этанола.— Бюлл. exper. биол., 1982., № 7, с. 35—37.
- Майский А. И. Генетические маркеры алкоголизма.— В кн.: Всесоюзный симпозиум «Новые отечественные препараты, применяемые в психиатрии и наркологии, и теоретические основы их разработки».— М., 1981, с. 59.
- Шошина С. В., Майский А. И. Главная система гистосовместимости мыши (H-2) и реакция организма на этанол.— Бюлл. exper. биол., 1982, № 7, с. 55—57.

- Airiksinen M. M., Mikhonen E. Affinity of β -carboline on rat brain benzodiazepine and opiate binding site.— Med. biol., 1980, vol. 38, N 6, p. 341—344.
- Airiksinen M. M., Kari J. β -carbolines psychoactive compound in the mammalian body.— Med. biol., 1981, vol. 59, p. 21—34.
- Buckholt N. S. Neurobiology of tetrahydro- β -carboline.— Life Sci., 1980, vol. 27, p. 893—903.
- Mandell L. W., Rosegray A., Walker R. W., Vandenkenvel W. J. 5-methyltetrahydrocarbolic acid as a mediator of the formation of pyridoindoles.— Science, 1974, vol. 186, p. 741—743.
- Myers R. D., Melcior C. L. Differential action on voluntary alcohol intake of tetrahydroisoquinolines and β -carboline infused chronically in the ventricle of the rat.— Pharmacol. Biochem. Behav., 1977, vol. 7, p. 381—392.
- Muller W. E. On the neuropharmacology of harmine and other β -carbolines.— Pharmacol. Biochem. Behav., 1981, vol. 14, N 5, p. 693—701.
- Naranjo P. Hallucinogenic fluid use and related endogenous belief systems in the equatorial Amazon.— J. Ethopharmacol., 1979, vol. 1, p. 121—145.
- Robertson H. A. Harmaline induced tremor: the benzodiazepine receptor as a site of action.— Europ. J. Pharmacol., 1980, vol. 67, p. 129—132.
- Rommelspacher H. 1-methyl- β -carboline a potent endogenous inhibitor of benzodiazepine receptor binding.— Arch. Pharmacol., 1980, vol. 314, p. 97—100.
- Rommelspacher H., Strauss S., Lindemann J. Excretion of tetrahydroharmans and harmine into the urine of man and rat after load with ethanol.— Febs. Lett., 1980, vol. 109, p. 209—212.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение	4
Глава 1. Опиатные рецепторы	6
Глава 2. Эндогенные лиганды с опиоидными свойствами. Их структура и функция	56
Глава 3. Механизм действия наркотических анальгетиков на уровне синаптической передачи нервных импульсов	116
Глава 4. Наркотики и эндокринная система	141
Глава 5. Метаболические эффекты наркотиков	162
Глава 6. Генетические аспекты патогенеза токсикоманий	205
Список литературы	240
Послесловие	246

*Алексей Иванович Майский, Наталья Николаевна Ведерникова
Владимир Всеволодович Чистяков, Владимир Валентинович Лакин*

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОМАНИЙ

Зав. редакцией Ю. В. Махотин. Редактор издательства С. В. Кузьмина.
Худ. редактор Н. А. Гурова. Переплет художника А. Е. Григорьева.
Техн. редактор С. П. Танцева. Корректор Л. А. Кокарева

ИБ № 3016

Сдано в набор 5.02.82. Подписано к печати 20.10.82. Т-15748. Формат бумаги 84×108¹/₃₂. Бум. тип. № 2. Литературная гарн. Печать высокая. Усл. печ. л. 13,44. Усл. кр. отт. 13,74. Уч.-изд. л. 14,36. Тираж 10 000 экз. Заказ № 4089. Цена 85 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Медицина», Москва, Петроверигский пер., 6/8.

Типография им. Смирнова Смоленского облуправления издательств, полиграфии и книжной торговли, г. Смоленск, пр. им. Ю. Гагарина, 2.

...	3
...	4
...	6
войствами. И	56
алгетиков на	
ых импульсов	116
...	141
...	162
команий	205
...	240
...	246

Ведерникова
Иванович Лакин

С. В. Кузьмина.
Григорьев.

Формат бумаги
сокая. Усл. печ.
з. Заказ № 4089.

«Издательство», Москва.

ательств. поли-
на, 2.

85 к.

МЕДИЦИНА 1982

БЛАГОУЧИНСТВЕННАЯ КОЛЛЕКЦИЯ